Über enzymatische Milchsäurebildung

Ein Beitrag zur Wirkungsweise des Insulins

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät (II. Sektion)

der Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt von

Rudolf Heckscher

aus Hamburg

am 18. Oktober 1926

Universitätsverlag von Robert Noske in Borna-Leipzig

1927

Über enzymatische Milchsäurebildung

Ein Beitrag zur Wirkungsweise des Insulins

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät (II. Sektion)

der Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt von

Rudolf Heckscher

aus Hamburg

am 18. Oktober 1926

Universitätsverlag von Robert Noske in Borna-Leipzig

1927

Berichterstatter: Geheimrat Prof. Dr. H. Wieland

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 1926

Meinen lieben Eltern!

Vorliegende Arbeit wurde im Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München ausgeführt.

Meinen hochverehrten Lehrern

Herrn Professor Dr. Richard KUHN,

auf dessen Anregung und unter dessen stets hilfsbereiter Leitung diese Arbeit entstand,

Herrn Geheimrat
Prof. Dr. Richard WILLSTÄTTER

und

Herrn Geheimrat Prof. Dr. Heinrich WIELAND

möchte ich auch an dieser Stelle für das meinen Studien entgegengebrachte Interesse meinen ehrerbietigsten Dank aussprechen.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Problemstellung 1

I. Kapitel.
Anaerober Kohlehydratstoffwechsel.

A. Vorwort 3
B. Die Milchsäurequellen 4
1. Historisches 4
2. Die Meyerhofsche Reaktion 7
3. Zymophosphat und Lactacidogen 9
4. Triosen und Methylglyoxal 12
C. Stereochemische Beziehungen 15
D. Übersicht 18

II. Kapitel.
Die Glyoxalase.

A. Vorkommen 20
B. Bestimmungsmethoden.
1. Nach H. D. Dakin und H. W. Dudley 21
2. Nach C. Neuberg 22
3. Titrimetrische Verfahren 24
C. Wesen und Wirkung des Enzyms 25
D. Glykolyse und Milchsäurebildung 30

III. Kapitel.
Zur Theorie der Oxydoreduktion.

A. Das Cannizzaro-System 32
B. Das Schardinger-Modell 38

IV. Kapitel.
Hilfsstoffe des Kohlehydratumsatzes.

Einführung 40
A. Insulin.
1. Chemische und physiologische Charakteristik 41
2. Insulin und Antiglyoxalase 44

Seite

3. Methodik und Ergebnis 46
B. Co-Zymase 47
C. Gestaltung und Ausblick 49

V. Kapitel.

Milchsäurebildung aus Methylglyoxal.

A. Zur Darstellung des Methylglyoxals 53
B. Ermittlung des Umwandlungsgrades.
1. Mikrobestimmung der gebildeten Milchsäure 56
2. Bestimmung des noch vorhandenen Methylglyoxals.
a) Nach R. Willstätter und G. Schudel 59
b) Nach F. Auerbach und E. Bodländer 63
c) Abgeänderte Verfahren 64
C. Zur Theorie der jodometrischen Bestimmungsmethoden 67
D. Hydroxyl-ionen-katalyse und Pufferwirkungen 70
E. Kinetik der Milchsäurebildung.
1. Kontrollversuche 72
2. pH-Kurve 73
3. Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit 75
4. Einfluß der Substratkonzentration 76
5. Zeitlicher Verlauf 77
6. Umwandlungsgrenze 80
F. Enzymlösungen.
1. Bereitung 81
2. Dialyse 84
3. Haltbarkeit 84
4. Versuch mit Takadiastase; Wirksamkeitsvergleiche 86

VI. Kapitel.

Mandelsäurebildung aus Phenylglyoxal.

A. Phenylglyoxal-Darstellung 88
B. Kinetik der Mandelsäurebildung 90

VII. Kapitel.

Aktivatoren und Hemmungskörper der Glyoxalase.

A. Versuche mit Insulin 93
B. Co-Zymase 98
C. Trennung von Trypsin und Antiglyoxalase 101
D. Addition verschiedener Glyoxalasen 102

Problemstellung.

Die Milchsäure, die uns im Ab- und Aufbau der Kohlehydrate begegnet, geht als temporäres Stabilisierungsprodukt aus dem Zerfall der Sechs-Kohlenstoffkörper hervor. Mit ihrer Bildung erschöpft sich die Anoxybiose, die Glykolyse, mit ihrer Resynthese zu Zucker gewinnt der Organismus einen großen Teil seiner verausgabten Energievorräte zurück. Die Frage nach den durchlaufenen Stadien zwischen Hexosen einerseits und Milchsäure andererseits ist immer mehr und mehr in den Brennpunkt des Interesses gerückt. Die Entdeckung enzymatischer Disproportionierung von Keto-aldehyden in Oxysäuren hat dem Methylglyoxal als direkte Vorstufe der Milchsäurebildung eine Vorrangsstellung zugewiesen. Dem Mangel an schnellen und zuverlässigen analytischen Methoden für die als Glyoxalasen gekennzeichneten Enzyme ist es zuzuschreiben, daß bis heute noch kein sicheres Bild von dieser fundamentalen Reaktion des Zuckerumsatzes existiert. Vorliegende Untersuchung liefert eine neue einfache Bestimmungsmethode für die Methylglyoxalase. Dank ihrer werden die kinetischen Verhältnisse der Glyoxalasen erläutert und entwickelt, es werden für sie die enzymatischen Grundgesetze aufgestellt, so daß die reaktionskinetische Eigenart dieser Enzymgruppe gegenüber wohlbekannten Klassen anderer Enzyme hervortritt. Physiologisch gestattet die genauere Erforschung der letzten Phase des anaeroben Kohlehydrat-Stoffwechsels, unsere Kenntnisse vom Gesamtbild der Glykolyse zu vertiefen.

Es ist bekannt, daß für die Regulation des Zuckerhaushalts im lebenden Organismus das Insulin verantwortlich ist. Wir wissen noch nicht, an welcher Stelle der Einfluß des Pankreashormons einsetzt. Nachdem es bisher weder gelungen ist, eine direkte

Insulinwirkung zwischen Glykogen und Hexose nachzuweisen, noch die Bildung einer besonderen labilen Bereitschaftsform der Glucose gesichert schien, lag die Vermutung nahe, daß wir den Angriffspunkt des Insulins in die Phase Methylglyoxal → Milchsäure zu verlegen haben. Dieser Gedanke wird im letzten Teil dieser Arbeit experimentell geprüft. Das Ergebnis ist, daß zahlreiche Insulinpräparate einen sichtbaren Hemmungseffekt auf die enzymatische Milchsäurebildung auslösen, die reinsten Hormonpräparate sich aber als frei von dieser Erscheinung zeigen. Ein dem Insulin bei der Bereitung sehr weitgehend anhaftender Begleitstoff offenbart hiermit seine Existenz. Das Eingreifen des Insulins in den Kohlehydrat-Stoffwechsel wird auf bestimmtere Bahnen verwiesen; ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Milchsäureproduktion und Insulinwirkung wird in Frage gestellt.

I. Kapitel.

Anaerober Kohlehydratstoffwechsel.

A. Vorwort.

Die Erhaltung des Lebens ist verknüpft mit der Aufnahme und Umsetzung von Eiweiß, Fett und Kohlehydrat. Diese drei Klassen gelten als die Speicher des Bau- und Betriebstoffwechsels tierischer und pflanzlicher Zellen. Der heutige Stand unserer Kenntnisse von Chemie und Physiologie gestattet es uns, eindringliche Vorstellungen vornehmlich vom Kohlehydratstoffwechsel zu gewinnen. Dieses findet darin leicht seine Erklärung, daß einerseits der rein strukturelle Aufbau des Eiweißmoleküls immer noch nicht völlig bekannt, auf der anderen Seite sich der Aufklärung des Fettstoffwechsels durch seine mannigfaltigen Beziehungen zu den übrigen biologischen Systemen große Schwierigkeiten entgegenstellen.

Daß Eiweiß und Fett[1]) als Zuckerbildner in Frage kommen, ist seit den Versuchen von E. F. W. Pflüger erwiesen. In vorliegender Arbeit sollen diese Beziehungen keine besondere Berücksichtigung finden, um so mehr, als es bisher einwandfrei erscheint, daß zahlenmäßig Eiweiß und Fett unter normalen Verhältnissen als Quelle für Kohlehydrat nur untergeordnete Bedeutung besitzen[2]).

---

[1]) Die Bildung von Fett aus Eiweiß ist umstritten. M. v. Pettenkofer und C. Voit plaidoyieren für und E. Pflüger z. B. gegen diese Möglichkeit.

[2]) Vgl. zusammenfassende Darstellung: M. Cremer, E. P. **1**, 1 (1902), sowie E. Pflüger u. P. Junkersdorf, P. A. **131**, 201 u. 302 (1910), **137**, 269 (1911). Über gekoppelten Fett- und Kohlehydratstoffwechsel s. a. bei H. v. Euler, Bioch. Zs. **164**, 18 (1925).

Die Erfahrungen des vorigen Jahrhunderts haben uns bereits die Vorstellung überliefert, daß Kohlehydrat im Organismus als Reservestoff in Form von Glykogen in der Leber und Muskulatur abgelagert wird, und bei Energiebedarf die Zelle dies Depot angreift, indem Glykogen fermentativ zu einfachen Monosacchariden gespalten und diese dann zu Kohlensäure und Wasser verbrannt werden. Schon aus dem Vergleich der Konstitutionsformeln für Glykogen $(C_6H_{10}O_5)_x$, Monosaccharid $C_6H_{12}O_6$ mit derjenigen für CO_2 und H_2O ergibt sich, daß eine Zertrümmerung zu so einfachen Bruchstücken nicht ohne Auftreten intermediärer Spaltprodukte denkbar ist.

Die Erforschung und Aufklärung dieser Zwischenstufen, Chemie und Physiologie seit nunmehr 50 Jahren in gleich hohem Maße interessierend, bildet heute den Gegenstand der Lehre vom intermediären Kohlehydratstoffwechsel. Die entscheidenden Anstöße zu ihrer Begründung empfing sie durch zwei große Entdeckungen: Das Auffinden der Milchsäure im Muskelsaft[3]) durch Berzelius und Liebig und die Einführung des Begriffes „Glykolytisches Ferment" durch R. Lépine[4]) und Cl. Bernard[5]). Diese beiden Befunde waren von so grundlegender Bedeutung, daß man wohl sagen kann, sie haben die erste Epoche im Kohlehydratstoffwechsel eröffnet.

B. Die Milchsäurequellen.

1. Historisches[6]).

Im Jahre 1807 gelang Berzelius zu der Feststellung, daß in den Muskeln gehetzten Wildes eine Säure auftrete, die er als

---

[3]) J. Berzelius, Abhandlungen über tierische Chemie **II**, 430, Stockholm 1808; J. v. Liebig, A. **62**, 257 (1847).

[4]) C. r. **110**, 742 (1890).

[5]) Cours de physiologie au Collège de France **I**, 379—392 (1855).

[6]) Moderne Zusammenfassungen finden sich insbesondere bei C. Oppenheimer-R. Kuhn, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl. Leipzig (Verlag G. Thieme) 1924/26, und zwar §§ 902, 903; ebenso bei A. Gottschalk, Der Kohlenhydratumsatz in tierischen Zellen, Jena (Verlag G. Fischer) 1925, S. 5 ff.

Milchsäure bezeichnete und mit der Säure, die 1780 von Scheele entdeckt war, identisch sei (a. a. O. 3). J. v. Liebig und später J. Wislicenus[6a]) isolierten die aus dem Muskelsaft frisch getöteter Tiere gewonnene Säure als Zinksalz. Liebig schrieb damals in seiner so berühmt gewordenen Abhandlung[7]): „Über die Bestandteile der Flüssigkeit des Fleisches“:

„Aus diesen Analysen ergibt sich mit Evidenz, daß die in dem Organismus der Tiere vorkommende stickstofffreie Säure identisch mit der Säure ist, welche in der Milch beim Sauerwerden entsteht, und in welche Milchzucker, Amylose, Traubenzucker und Rohrzucker bei Berührung mit in Zersetzung begriffenen Tiersubstanzen übergeführt werden.“

Damit prägte sich der Begriff „Fleischmilchsäure“. 1859 wies E. Dubois-Reymond[8]) darauf hin, daß die freie Milchsäure nicht im ruhenden, sondern erst im ermüdeten oder totenstarren Muskel zu finden sei. Diese Berichtigung des berühmten Physiologen war fundamental. Die postmortale Milchsäurebildung war übrigens schon Liebig bekannt. Jedoch hielt er den im toten Muskel sich abspielenden chemischen Vorgang irrtümlich für einen Lebensprozeß, da der isolierte Muskel Kohlensäureproduktion zeigte[9]).

M. Werther[10]) stellte als erster Glykogenschwund und Milchsäurebildung im Organismus zur Diskussion.

Den Ursprung der Milchsäure erklärte sich Cl. Bernard[11]) rein fermentativ: «J'ai reconnu autrefois cette fermentation lactique de la matière glycogène, d'abord dans les muscles du fœtus, où elle présente son summum d'intensité; je l'ai constatée plus tard chez l'homme et les animaux adultes. J'ai vu également la fermentation lactique dans le sang.»

[6a]) A. **167**, 302 (1873).

[7]) A. **62**, 257, 330 (1847).

[8]) Sitz.-Ber. Berl. Akad. **1859**, 288 u. 853.

[9]) Vgl. ausführlicher: Fr. Valentin, Über das Vorkommen der Blutmilchsäure, Inaugural-Diss., München 1924.

[10]) P. A. **46**, 63 (1890).

[11]) Leçons sur le diabète et la glycogenèse animale, Paris 1877, S. 328.

In zahlreichen Aufsätzen behandelten daneben die Franzosen Lépine[12]), Barral und Arthus die Frage des glykolytischen Ferments. Es gelingt ihnen dabei der wichtige Nachweis, daß die Glykolyse auch bei vollständiger Abwesenheit von Mikroorganismen verläuft. In einem Vortrag aus dem Jahre 1891 äußert sich F. Hoppe-Seyler[13]) bereits sehr treffend und vorausschauend: „Die Bildung von Milchsäure bei Abwesenheit von freiem Sauerstoff und bei Gegenwart von Glykogen oder Glucose ist höchstwahrscheinlich eine Eigenschaft aller lebenden Protoplasmen."

Das Verdienst von A. Magnus-Levy[14]) war es, hervorgehoben zu haben, daß mit der Autolyse der Organe eine starke Vermehrung der Milchsäure einhergeht.

Die Milchsäurebildung im Organismus ist — wie man bisher annehmen könnte — jedoch nicht auf den arbeitenden und toten Muskel beschränkt, sondern sie vollzieht sich tatsächlich in nahezu allen Organen[15]). In ruhenden Zellen ist die Glykose im allgemeinen gering, in wachsenden Geweben dagegen sehr groß[16]). Die Carcinomzelle lebt geradezu von der Milchsäurebildung, d. h. sie gewinnt ihre Lebensenergie größtenteils aus der anaeroben Zuckerspaltung.

Nach all diesen Befunden scheint es kaum verwunderlich, wenn die Milchsäure der Glykolyse mehr und mehr ihr Gepräge verlieh, eine Vorstellung, die besonders durch die Experimente der Neuzeit geweckt und gefestigt worden ist.

---

[12]) R. Lépine, Le ferment glycolytique et la pathogénie du diabète, Paris 1891. Ferner: Etat actuel de la question de la glycolyse, Semaine médicale 1911.

[13]) Festschrift für R. Virchow **1**, Berlin 1891, ref. Chem. Ber. **25** 685 (1892).

[14]) Über die Säurebildung bei der Autolyse der Leber, Hofm. Beiträge **2**, 261 (1902).

[15]) Vgl. Beilstein, Handb. d. org. Chem. 4. Aufl. **III**, 262.

[16]) O. Warburg, K. Posener u. E. Negelein, Bioch. Zs. **152**, 309 (1924).

2. Die Meyerhofsche Reaktion.

Zwischen anoxybiontischem und oxybiontischem Abbau im energieliefernden Stoffwechsel wurde scharf getrennt. Dabei ist nach O. Meyerhof zu berücksichtigen, daß die anaerobe Phase nicht als die Vorstufe der aeroben zu betrachten ist, sondern beide Stufen haben nebeneinander „ihren eigenen biologischen Sinn". Die hervorragenden Arbeiten von W. M. Fletcher und F. G. Hopkins[17]), von G. Embden[18]) und später diejenigen von A. V. Hill[19]) und O. Meyerhof haben einwandfrei dargetan, daß die Milchsäure bei der Muskelkontraktion die ausschlaggebende Rolle spielt, indem ihr Auftreten und Verschwinden für die anoxybiontische Ermüdung und die oxybiontische Erholung verantwortlich zu machen ist. O. Meyerhof gelangte experimentell schließlich zu der Feststellung, daß zwischen anaerob gebildeter Milchsäure und geschwundenem Kohlehydrat völlige Äquivalenz besteht[20]).

Es zeigte sich weiterhin, daß das glykolytische Ferment[21]) letzten Endes mit der Überführung von Kohlehydrat in Milch-

---

[17]) Jl. of Physiol. **35**, 247 (1907).

[18]) G. Embdens Ansicht deckt sich allerdings nicht mit derjenigen von Meyerhof. Nach Embden (Handbuch d. Physiol. **8**, 408) bildet sich zu Beginn einer Kontraktion verhältnismäßig viel Phosphorsäure und wenig Milchsäure. Während der Fortdauer der Kontraktion häuft sich nun die Milchsäure an, und die Phosphorsäure verschwindet infolge Synthese von Lactacidogen. Im Gegensatz zu Meyerhof schreibt also Embden dem Ab- und Aufbau des Lactacidogens die ursächliche Wirkung von Erregung und Ermüdung des Muskels zu.

[19]) A. V. Hill, Jl. of Physiol. **44**, 466 (1912), **46**, 28 u. 435 (1913); E. P. **15**, 340 (1916); Science **60**, 505 (1924).

[20]) O. Meyerhof, P. A. **175**, 20, 88 (1919), **204**, 295 (1924); Klin. W. **1**, 230 (1922), **3**, 392 (1924); Bioch. Zs. **168**, 128 (1926).

[21]) Ich stelle mir unter dem glykolytischen Ferment einen Fermentkomplex vor, dessen Wirkung ähnlich der des noch umfassenderen Zymasekomplexes mit einer Aufteilung in enzymatische Einzelvorgänge eindringlicher charakterisiert werden kann. Ob man nun das Ende des glykolytischen Ferments vor oder hinter die Glyoxalase setzt, ist wohl eine reine Angelegenheit der Definition. Heute läßt sich hierin eine gerechte Entscheidung noch nicht er-

säure, dem Ablaufe der anaeroben Phase, zu einem einzigen Begriffe verschmolz. Bei Sauerstoffzutritt hört die Glykolyse in den meisten Geweben auf, und die entstandene Milchsäure verschwindet. Sie wird aber nicht, wie man früher vielfach annahm, vollständig verbrannt, sondern — und das ist die fundamentale Entdeckung von O. Meyerhof — zu $^3/_4$ bis $^4/_5$ in einer gekoppelten Reaktion zu Glykogen synthetisiert.

Dabei ist ein R.-Q. des gesamten Prozesses von genau = 1 für sich allein nicht geeignet, die Behauptung zu stützen, daß nur Kohlehydrat als Quelle der Milchsäure in Frage kommt. Denn erstens hat die Milchsäurebildung aus Kohlehydrat überhaupt keinen R.-Q., zweitens würde unter der Voraussetzung, daß Eiweiß oder andere Substanzen als Milchsäurelieferanten in Frage kämen, dies noch keine Veränderung im R.-Q. auszulösen brauchen, da die entstehende Milchsäure ja zunächst nach Meyerhof vollkommen zu Kohlehydrat resynthetisiert werden kann.

Die quantitativen Beziehungen zwischen Glucoseabbau und Zuckergenese erweiterten J. Parnas und J. Baer[22]) durch ihre Versuche an der isolierten Schildkrötenleber. Als zuckerbildend fanden sie Milchsäure, Glycerinsäure, Glykol-aldehyd-dicarbonsäure und Glykol-aldehyd. Parnas und Baer schlossen daraus, daß der Weg Milchsäure → Glucose über diese genannten Zwischenstufen führen müsse. A. R. Mandel und G. Lusk[23]) traten bereits im Jahre 1906 für die Reversibilität der Vorgänge Glykogen ⇄ Glucose ⇄ Milchsäure ein, da sie durch Milchsäurezufuhr eine Steigerung von Glucosurie bei phloridzin- und pankreasdiabetischen Tieren herbeizuführen vermochten.

Die Versuchsergebnisse von F. Hofmeister[24]), Mandel und Lusk und diejenigen von Parnas und Baer kann man als

---

bringen, da das bisherige Verhalten der Glyoxalase nicht zur Genüge eine Sonderstellung des Enzyms rechtfertigt.

[22]) Bioch. Zs. **41**, 386 (1912).

[23]) Amer. Jl. of Physiol. **16**, 129 (1906); ferner G. Lusk, Bioch. Zs. **156**, 334 (1925).

[24]) Sammlung Nothnagel-Stiftung 1913 Nr. **1** S. 1.

die Vorläufer unserer heutigen Anschauung betrachten, daß Milchsäure im Organismus nicht restlos oxydiert wird, sondern als ein Produkt temporärer Stabilisierung anzusehen ist. Die Aufbringung der für die Rückverwandlung von Milchsäure in Glykogen erforderlichen Energie schob Lusk[25]) den Verbrennungsprozessen äquivalenter Teile Kohlehydrat oder Fett zu. In Anlehnung an die Diabetestheorie von R. T. Woodyatt[26]) vertritt Lusk die Anschauung, daß Milchsäure überhaupt nicht oxydiert werden kann.

Aus den Sätzen: „Die Atmung beseitigt den Spaltungsstoffwechsel nicht durch Oxydation der Spaltprodukte, sondern dadurch, daß sie ihn rückgängig macht" entwickeln sich die Meyerhofschen Kreisprozesse[27]) und der Oxydationsquotient der Milchsäure $\left(\frac{\text{anaerobe Glykolyse} - \text{aerobe Glykolyse}}{\text{Atmung}}\right)$, beides heute fest fundierte, leuchtende Eckpfeiler im ganzen Milchsäureproblem.

Lediglich unentschieden bleibt nun die Frage, ob derjenige Anteil Milchsäure, etwa $^1/_4$ des gesamten, der oxydativ weiter verschwindet, aus der gebildeten Milchsäure selbst stammt, oder zunächst die ganze Milchsäure resynthetisiert und ein äquivalenter Teil Kohlehydrat dafür wieder oxydiert wird. Die in diesem Punkte ursprünglich konträren Anschauungen von Lusk und Meyerhof[28]) haben sich jedenfalls neuestens weitgehend genähert.

3. Zymophosphat und Lactacidogen.

Während bei der alkoholischen Hefegärung das Auftreten von Milchsäure rein nebensächlich sich darbietet, drängt ihr Erscheinen auf anderen Gebieten, so in wachsenden Geweben und

---

[25]) l. c. 23).

[26]) In Wells's Chem. Pathol., Philadelphia u. London, 2. Aufl. (1924).

[27]) O. Meyerhof, Über den Zusammenhang der Spaltungsvorgänge mit der Atmung in der Zelle, Chem. Ber. **58**, 991 (1925); vgl. auch O. Meyerhof, Nobelvortrag, Stockholm 1924.

[28]) Bioch. Zs. **158**, 218 (1925).

bei der bakteriellen Milchsäuregärung[29]), immer mehr zu der Fragestellung, auf welchem Wege mag sie entstehen, und auf welchem mag sie verschwinden. Daß sie nicht durch direkten Zerfall von Glykogen oder der Hexosekette gebildet werden kann, ergibt sich aus der chemischen Konstitution der Milchsäure als α-Oxy-propionsäure gegenüber der für Glucose von $C_6H_{12}O_6$, in der weder eine Methyl- noch eine Carboxyl-Gruppe präformiert zutage tritt. Außerdem spricht die optische Natur der produzierten Fleischmilchsäure, die bekanntlich rechts dreht und genetisch der l-Reihe angehört, während der im Körper kreisende Traubenzucker rechts dreht und ebenso ein Mitglied der d-Reihe ist, gegen eine direkte Auflösung der Hexosekette bis zur Milchsäurestufe. Die optischen Besonderheiten werden später noch ausführlicher diskutiert.

An Theorien über etwaige Zwischenstufen hat es wahrlich nicht gefehlt. Einen Anhaltspunkt schien die im Jahre 1908 bei der alkoholischen Gärung entdeckte Hexosediphosphorsäure von Harden und Young[30]) zu bieten. Die Struktur dieser Verbindung ist nicht restlos aufgeklärt. Young selbst hält folgende zwei Formeln für die wahrscheinlichsten:

$$\begin{array}{l} CH_2 \cdot PO_4H_2 \\ | \\ CO \\ | \\ C_4H_8O_3 \cdot PO_4H_2 \end{array} \qquad \begin{array}{l} CHO \\ | \\ CH \cdot PO_4H_2 \\ | \\ C_4H_8O_3 \cdot PO_4H_2 \end{array}$$

Die Phosphorylierung verläuft nach den Gleichungen:

I. $2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,PO_4HR_2 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_5OH + 2\,H_2O + C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2$.

II. $C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2\,H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2\,PO_4HR_2$.

---

[29]) Über den Chemismus der Milchsäuregärung durch Bac. coli vgl. bes. die neueren Arbeiten von E. Aubel et J. Salabartan, C. r. **1925**, 1183 u. 1784.

[30]) A. Harden und W. J. Young, Proc. roy. soc. London, (B) **77**, 417 (1906), (B) **80**, 299 (1908); Bioch. Zs. **32**, 173 (1911).

Es bleibt beachtenswert, daß die Veresterung nach Harden nicht vor der Gärung erfolgt, sondern die Gärung von der Esterbildung begleitet wird.

Der Mechanismus von Veresterung und Spaltung ist so zu verstehen, daß der Zucker zuerst mit Phosphat verestert wird und die Verseifung des Esters die betreffende Hexose zur Spaltung anregt.

Ohne auf das Wesen der Zymophosphat-Bildung und -Spaltung hier näher eingehen zu können, möchte ich sogleich auf das entsprechende Analogon der tierischen Zelle, dem Lactacidogen Embdens, übergehen. Embden[31]) gelang es zunächst mittels Organ-Preßsäften Milchsäurebildung zu erzeugen, sowie damit zugesetzte Hexose-di-phosphorsäure erneut in Milchsäure und Phosphorsäure zu spalten. Diese Beobachtung war für Embden der Anlaß, auch der tierischen Zelle einen Kohlehydrat-phosphorsäure-komplex zuzuweisen, die er Lactacidogen nannte und als Vorstufe der in vivo sich bildenden Milchsäure ansah. Bekräftigt wurde diese Annahme, als Embden, Laquer und Zimmermann[32]) nachweisen konnten, daß auf Grund identischer Osazone und Brucinsalze Zymophosphat und Lactacidogen dieselben Körper seien.

Entgegen seiner ursprünglich vertretenen Ansicht konnte A. J. Virtanen[33]) die Bedeutung der Veresterung von Phosphorsäure mit den Hexosen auch für die Milchsäuregärung durch Bact. casei ε wahrscheinlich machen[34]). Somit war die alkoholische Gärung, die Milchsäurebildung im Muskel und die bakterielle Milchsäuregärung auf ein einziges Hexosephosphat zurückgeführt.

---

[31]) G. Embden, E. Kalberlah u. H. Engel, Bioch. Zs. **45**, 45 (1912); G. Embden, W. Griesbach u. E. Schmitz, H. **93**, 1 (1914/15).

[32]) G. Embden u. F. Laquer, H. **93**, 94 (1914/15), **113**, 1 (1921); G. Embden u. M. Zimmermann, H. **141**, 225 (1924).

[33]) H. **134**, 300 (1924).

[34]) H. **138**, 136 (1924), **143**, 71 (1925).

Diese einfache Vorstellung hat sich jedoch nicht bis auf die letzten Tage behaupten können.

Embden gibt nämlich jetzt[35]) selbst zu, daß das reine kristallisierte Lactacidogen stickstoffhaltig ist, also unter Umständen ein ganz anderer komplexerer Stoff als das Hefe-Zymophosphat sein kann. Da außerdem die quantitativen Beziehungen zwischen Lactacidogenspaltung und der Meyerhofschen Reaktion nicht übereinstimmen, ferner ein Zusammenhang von Lactacidogenbildung und dem übrigen Abbauprozeß nur für den quergestreiften Muskel und die roten Blutkörperchen erkennbar ist, so läßt sich — um mit Oppenheimer[36]) zu reden — „eine klare Entscheidung dieses Fundamentalproblems der Muskelphysiologie" heute noch nicht erbringen.

Konstitutionell ist man sich über das Lactacidogen noch weniger klar als über das Zymophosphat. Nach den Versuchen von F. Laquer und K. Griebel[37]), die im Froschmuskelbrei durch Zusatz von α-Glucose stärkere Milchsäurebildung fanden als durch β- oder α,β-Glucose, scheint bis zum gewissen Grade die Vorstellung der Autoren berechtigt, daß die Bindungen im Lactacidogen α-glucosidischer Natur sind.

4. Triosen und Methylglyoxal.

Neben dem Lactacidogen als direkte Vorstufe der Milchsäure wandte sich das Hauptinteresse vornehmlich drei Körpern zu: Dioxyaceton, Glycerinaldehyd und Methylglyoxal.

Für die Triose Glycerinaldehyd als Zwischenstufe des animalischen Kohlehydratstoffwechsels sprechen die Durchströmungsversuche von G. Embden[38]) an überlebender Hundeleber, die nach Zusatz von dl-Glycerinaldehyd zur Milchsäureproduktion

---

[35]) Zit. nach C. Oppenheimer, l. c. 6), XVIII. Hauptteil, 1460 und XIX. Hauptteil, 1633.

[36]) Opp., D. Ferm., 1640.

[37]) H. **138**, 148 (1924).

[38]) G. Embden, K. Baldes u. E. Schmitz, Bioch. Zs. **45**, 108 (1912); G. Embden, E. Schmitz u. M. Wittenberg, H. **88**, 210 (1913).

[dl– und d(–)] und d-Sorbosebildung angeregt wurde. Ebenso fand Parnas[38a]) in der mit Glycerinaldehyd und Sauerstoff durchspülten Leber Glykogenanreicherung. Für Dioxyaceton gilt annähernd das gleiche. Gegen die vermittelnde Rolle des Glycerinaldehyds und Dioxyacetons sprechen aber eine Anzahl Tatsachen[39]). Einerseits wird Glycerinaldehyd von Hefe nicht angegriffen — bei Dioxyaceton gelang es C. Neuberg und A. Gottschalk[40]) in 9 Versuchen nur in einem Falle eine Vergärung zu konstatieren, und auch H. O. L. Fischer und C. Taube[41]) fanden nur eine einzige Hefe, die Dioxyaceton bis zu 80% zu vergären vermochte, — andererseits zeigten jüngst A. J. Virtanen, H. Karström und R. Bäck[42]), daß die Milchsäurebakterien, Streptococcus lactis und Bact. casei ε Glycerinaldehyd und Dioxyaceton als Kohlenstoffquelle nicht auszunützen vermögen. Zudem weisen die neuesten Berichte von O. Meyerhof und K. Lohmann[43]) sehr deutlich darauf hin, daß Lösungen von kristallisiertem Glycerinaldehyd und kristallisiertem Dioxyaceton selbst in den stärkst glykolysierenden Geweben wie in der Retina keine nennenswerten Milchsäuremengen produzieren.

Alle vorangegangenen Tatsachen im Verein mit der Entdeckung der enzymatischen Überführbarkeit von Methylglyoxal in Milchsäure waren es schließlich, die heute dem Methylglyoxal als Milchsäurevorstufe eine Vorrangsstellung gegenüber seinen übrigen Konkurrenten der Drei-Kohlenstoffreihe zuwiesen. Rein chemisch läßt sich für das intermediäre Auftreten dieses Ketoaldehyds noch nicht viel ins Feld führen. So sei die Bildung von Methylimidazol aus Glucose und Zinkhydroxyd-Ammoniak er-

---

[38a]) J. Parnas, Zbl. Physiol. **26**, 671 (1912).
[39]) Siehe z. B. W. D. Sansum u. R. T. Woodyatt, C. **1917**, I, 26/27.
[40]) Bioch. Zs. **154**, 487 (1924).
[41]) Chem. Ber. **57**, 1502 (1924).
[42]) H. **151**, 232 (1925).
[43]) Bioch. Zs. **171**, 381 (1926), und zwar 400.

wähnt[44]), ferner die Umwandlung von vielen Hexosen in Methylglyoxal bei Einwirkung von m/10 sekundärem Phosphat oder Bicarbonatlösung[45]). Auch Alanin liefert nach Dakin und Dudley beim Erhitzen in schwach saurer Lösung Methylglyoxal[46]). Hier zeigt sich bereits ein in vitro belegtes Ineinandergreifen von Eiweiß- und Zuckerstoffwechsel. Bei der bakteriellen Milchsäuregärung scheint Methylglyoxal nicht als Zwischenstufe in Betracht zu kommen[47]), jedoch begegnet man hier Widersprüchen[47a]). Es ist besonders hervorzuheben, daß es bis heute noch nicht gelungen ist, Methylglyoxal im lebenden Organ festzuhalten oder abzufangen, wie dies eben für Milchsäure und Acetaldehyd geglückt ist. Solange dieses Experiment aussteht, haftet natürlich auch der Vorstellung, daß Methylglyoxal eine wirklich durchlaufende Zwischenstufe beim intermediären Zuckerumsatz bildet, eine gewisse Schwäche an. Die umgekehrte Forderung, nämlich die Überführbarkeit von Methylglyoxal in Zucker, erfüllten bereits Dakin und Dudley durch ihre Versuche an phloridzin-diabetischen Hunden[48]).

Von hoher Bedeutung erscheint mir der leichte Übergang[49]) von Glycerinaldehyd und Dioxyaceton in Methylglyoxal, denn somit fallen alle Errungenschaften, die für die beiden Triosen als Zwischenstufen erzielt wurden, letzten Endes auch dem Methylglyoxal zu. A. Wohl diente diese spielend leichte Überführbar-

---

[44]) A. Windaus u. F. Knoop, Chem. Ber. **38**, 1166 (1905); A. Windaus, Chem. Ber. **39**, 3886 (1906), **40**, 799 (1907); K. Inouye, Chem. Ber. **40**, 1890 (1907).

[45]) G. Pinkus, Chem. Ber. **31**, 31 (1898); H. D. Dakin u. H. W. Dudley, Jl. Biol. Chem. **15**, 127 (1913); C. Neuberg u. W. Oertel, Bioch. Zs. **55**, 495 (1913), **71**, 144 (1915).

[46]) Jl. Biol. Chem. **14**, 555 (1913).

[47]) A. J. Virtanen u. H. Karström, H. **155**, 251 (1926).

[47a]) Siehe die Arbeiten von A. Fernbach, sowie von E. Aubel, zit. nach Opp., D. Ferm. S. 1449.

[48]) Jl. Biol. Chem. **15**, 127 (1913).

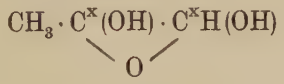
[49]) A. Wohl, Bioch. Zs. **5**, 45 (1907); C. Neuberg u. E. Kansky, Bioch. Zs. **20**, 461 (1909).

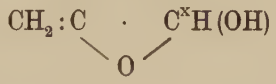
barkeit von Glycerinaldehyd in Methylglyoxal bekanntlich zur Grundlage seines Gärungsschemas.

C. Stereochemische Beziehungen.

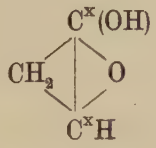
Die Schwierigkeiten, die daraus erwuchsen, daß Methylglyoxal selbst nicht vergärbar ist, ferner die optische Drehung der mit Organ- und Gewebsextrakten erhaltenen Milchsäure verglichen mit dem Drehungssinn des natürlich vorkommenden Antipoden gaben für die Vorstellung Veranlassung, daß die künstlich bereitete Form des Methylglyoxals, der wir nach den Gesetzen der Strukturchemie die Formel $CH_3CO \cdot CHO$ zuerkennen, nicht identisch sein kann mit dem wahren biologischen Bild.

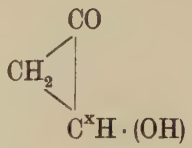
Einen Ausweg suchte C. Neuberg. Durch Ausnützung aller erdenklichen Hydratformen und Keto-Enoltautomerien zog er für den Ketoaldehyd nicht weniger als 22 monomolekulare Strukturbilder in Betracht[50]). Der wesentlichste Inhalt der verschiedenen Konfigurationsmöglichkeiten ist, daß man halbacetalartige, optisch-aktive Symbole wie





wählen kann, die den Konfigurationswechsel auf dem Wege d-Glucose → l(+) Milchsäure bei der Stufe Methylglyoxal plausibel erscheinen lassen. Dagegen müssen Formelbilder wie





aus begreiflichen Gründen vollkommen ausscheiden. Wenn jedoch kein optisch-aktives Methylglyoxal Muttersubstanz der aktiven

---

[50]) C. Neuberg u. J. Hirsch, Bioch. Zs. **96**, 175 (1919), und zwar 177.

Milchsäure sein sollte, so dürfte asymmetrische Katalyse nach G. Bredig[51]) stattfinden.

Der natürlichen Milchsäure (l(+))[52]) optisch entgegengesetzt drehende Säure erhielten G. Embden, K. Baldes und E. Schmitz[53]) aus inaktivem Glycerinaldehyd, ferner H. D. Dakin und H. W. Dudley[54]) aus Phenylglyoxal ein Gemisch von inaktiver und linksdrehender Mandelsäure. Embden deutet das Entstehen von racemischer und aktiver Milchsäure so, daß Dioxyaceton die Muttersubstanz für die racemische Säure und optisch-aktiver Glycerinaldehyd Bildner der entsprechend aktiven Milchsäure sei. Neuberg[55]) hält es dagegen für viel gesicherter — besonders im Hinblick auf die optisch-asymmetrischen Synthesen von A. Mc. Kenzie[56]) und W. Marckwald und L. Karczag[57]) —, eine „Induktion optischer Aktivität" anzunehmen, indem nämlich aktives Ausgangsmaterial einen richtenden Einfluß auf den Drehungssinn eines über ein symmetrisches Zwischenprodukt hinweg entstehenden aktiven Körpers geltend macht. Experimentell faßten Neuberg[58]) wie Dakin[59]) mittels Glyoxalase aus Methylglyoxal neben racemischer Milchsäure überwiegend die d(–) Form, also den körperfremden Antipoden. Dementsprechend fanden in jüngster Zeit O. Meyerhof und K. Lohmann, daß die Geschwindigkeit des Lactatverbrauchs und der

---

[51]) G. Bredig u. M. Minaeff, Asymmetrische Synthese der Katalyse, Festschrift zur Hundertjahrfeier, T. H. Karlsruhe 1925.

[52]) In dieser Untersuchung sind für Drehung und Konfiguration der Milchsäuren immer die Bezeichnungen von Wohl und Freudenberg gewählt. Es ist also l(+) Milchsäure = Fleischmilchsäure → gibt l(–) Lactat, alte Bezeichnung d-Milchsäure und d(–) Lactat. Während für den Antipoden d(–)Milchsäure und d(+) Lactat gilt, alte Bez. l-Milchsäure und l(–) Lactat.

[53]) Bioch. Zs. **45**, 108 (1912), und zwar 123.

[54]) Jl. Biol. Chem. **14**, 155, 423 (1913), **15**, 463, **16**, 505 (1913/14).

[55]) Bioch. Zs. **51**, 484 (1913), und zwar 508.

[56]) Jl. Chem. Soc. **87**, 1373 (1905), **89**, 688 (1906); A. Mc. Kenzie und H. A. Müller, Jl. Chem. Soc. **95**, 544 (1909).

[57]) Chem. Ber. **42**, 1518 (1909).

[58]) l. c. 55.

[59]) l. c. 54.

Zuckersynthese im intakten Froschmuskel mit d(+) Lactat etwa 4mal langsamer verläuft als mit l(−) Lactat, ebenso steht die durch d(−) Milchsäure bewirkte Atmungssteigerung in der Säugetierleber erheblich hinter derjenigen mit l(+) Milchsäure zurück[60]).

Hätte man nicht das Gegenteil erwarten sollen? Wenn im Stoffwechsel aus inaktivem Material vorwiegend l(+) Milchsäure gebildet wird, so wäre es doch wahrscheinlich, daß die d(−) Milchsäure als die zu den Hexosen genetisch verwandtere Form leichter assimiliert wird[61]). Meyerhof hätte also mit dem körperfremden Antipoden eine günstigere KH-Synthese erzielen müssen. Der Meyerhofsche Befund steht aber in bester Übereinstimmung mit den oben erwähnten Ergebnissen von Neuberg und Dakin. In dem von der Zellstruktur losgelösten Milieu scheinen also die optischen Verhältnisse gerade umgekehrt zu liegen wie im lebenden Organismus.

Die fermentative Umwandlung von Methylglyoxal durch Coli-Bazillus, Bac. propionicus und Lacto-Bac. erzeugt dagegen lediglich racemische Milchsäure[62]).

Ein inaktives Zwischenprodukt von der Art des Methylglyoxals oder des $\alpha\alpha'$-Dioxyacetons fordern K. Freudenberg und O. Huber[63]), denn die C-Atome 2 und 5 der Glucose, die später in der Milchsäure die asymmetrische Struktur auslösen, können infolge des Übergangs von der d- in die l-Reihe nicht unberührt bleiben, es muß eine inaktive Oxo-Stufe durchlaufen werden.

Wollte man die Gegensätze, die uns in den Anschauungen von Neuberg und Freudenberg begegnen, vereinigen, so

---

[60]) Naturw. **14**, 437 (1926); Bioch. Zs. **171**, 421 (1926). Die alten optischen Bezeichnungen für den Drehungssinn der Milchsäure, die Meyerhof immer noch anwendet, ersetzte ich hier der Einheitlichkeit halber durch die neuen Vorschläge von Wohl und Freudenberg, Chem. Ber. **56**, 309 (1923); s. auch Fußnote 52.

[61]) Siehe auch bei Opp., D. Ferm. S. 1465.

[62]) C. Neuberg und G. Gorr, Bioch. Zs. **166**, 482 (1926).

[63]) Chem. Ber. **58**, 148 (1924/25).

müßte man mit R. Kuhn[64]) annehmen, daß zwischen aktivem C_6-Zucker und aktiver Drei-Kohlenstoffreihe die inaktive Zwischenstufe liege. Dafür gibt es aber keine Anhaltspunkte. Am Beispiel der Phenylglyoxalase förderten R. Kuhn und E. Werle neues experimentelles Material zur Klärung der optischen Schwierigkeiten in diesem Gebiete. Sie fanden, daß die mit Schweineleberauszügen gewonnene Mandelsäure aus Phenylglyoxal sich aus annähernd gleichen Mengen der d(−) und der d,l-Form zusammensetzt. Mit 1 Mol l(+) trafen also 3 Mole d(−) Mandelsäure zusammen[65]).

Es ist eigentümlich und letzten Endes noch ungeklärt, warum in dem in vitro dem Zellmilieu so eng nachgeahmten Experiment nicht die natürliche Oxysäure, sondern zur überwiegenden Mehrheit der körperfremde Antipode erhalten wird.

D. Übersicht.

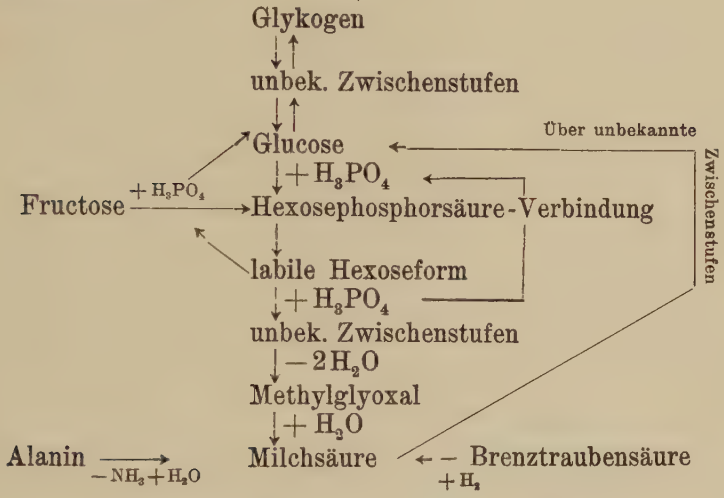
Einen durch Experimente gesicherten Weg zu zeichnen, der vom Glykogen bis zum Methylglyoxal verläuft, ist heute noch nicht möglich. Ja, nicht einmal der Gang Hexose → Methylglyoxal kann klar beleuchtet werden. Die Schriftentwürfe von A. Wohl rechnen mit einem gemeinsamen Aldol von Glycerinaldehyd und Methylglyoxal, die von Neuberg mit einem direkten Methylglyoxal-aldol als wahrscheinlichst gebildete erste Zerfallstufe. C. Oppenheimer glaubt[66]), daß wir hier wohl niemals „mit bestimmt gerichteten Vorgängen" rechnen dürfen, sondern hält ein Gleichgewicht zwischen einem oder mehreren Hydraten des Methylglyoxals mit Glycerinaldehyd und den beiden Aldolen für die plausibelste Erklärung.

Rein schematisch sei hier ein Überblick über die anaerobe Phase des animalischen Kohlehydratstoffwechsels beigefügt, in

---

[64]) R. Kuhn, Privatmitteilung.
[65]) R. Kuhn und E. Werle in noch unveröffentlichten Versuchen.
[66]) Opp., D. Ferm. S. 1451.

der Form, wie sie A. Gottschalk[67]) im vorigen Jahre vorgeschlagen hat.



Die Anoxybiose findet in der Milchsäurebildung ihre Begrenzung.

---

[67]) l. c. 6, S. 42.

II. Kapitel.

Die Glyoxalase.

A. Vorkommen.

Der Weg enzymatischer Milchsäureproduktion ist frühzeitig erkannt worden. In Deutschland war Liebig der erste, der auf diesen Prozeß hinwies[68]). Mit den Worten: «La matière glycogène du muscle subit incessament une fermentation lactique» legte ihn Cl. Bernard[69]) fest.

Feste Gestalt nahm dies ganze Problem jedoch erst an, als 1913 annähernd gleichzeitig H. D. Dakin und H. W. Dudley[70]) und C. Neuberg[71]) in der Glyoxalase ein Ferment kennen lehrten, das Methylglyoxal in Milchsäure umzuwandeln vermochte. Dakin konnte dartun, daß mit Hilfe der Glyoxalase nicht nur Methylglyoxal, sondern auch Glyoxal selbst, ferner Phenyl-, Isobutyl- und Benzylglyoxal in die entsprechenden Oxysäuren verwandelt werden. Mithin die Gleichung:

$$R \cdot CO \cdot CHO + H_2O \rightarrow R \cdot CHOH \cdot COOH$$

zu Recht besteht.

Das in der Natur so überaus verbreitete Vorkommen legt ein beredtes Zeugnis von der allgemeinen Bedeutung des Ferments ab. Neuberg und Dakin fanden es in der Leber und Musku-

---

[68]) A. **62**, 257 (1847).

[69]) l. c. 11, S. 428.

[70]) Jl. Biol. Chem. **14**, 155 und 423 (1913), **15**, 463 (1914).

[71]) Bioch. Zs. **49**, 502, **51**, 484, **55**, 495 (1913). Hinsichtlich der Priorität der Entdeckung und der Streitfrage über die Namenseignung des Enzyms vgl. man die betreffenden Schriften beider Autoren. Bioch. Zs. **59**, 193 (1914), **71**, 245 (1915); Jl. Biol. Chem. **14**, 505—507 (1913).

latur von Mensch und zahlreichen Tieren, wie z. B. Hund, Katze, Kalb, Schaf, Kaninchen, Kröte, Huhn, Kabeljau und Austern, ferner in Hefeauszügen und vielen grünen Pflanzen. Im Organismus findet es sich auch nahezu überall: so in Leber, Niere, Milz, Herz- und Skelettmuskel, Zunge, Lunge, Gehirn, Blutzellen und Magenschleimhaut. Dagegen sind glyoxalasefrei Blutserum, Lymphdrüsen und Pankreas. Die Drüsen Thymus, Thyreoidea, Nebenniere, Hypophyse enthalten wiederum das Enzym. Nach Levene[72]) findet es sich außerdem noch in Leukozyten. Neuberg wies es in den Milchsäure- sowie Coli-Bazillen nach[73]), sowie im Bac. propionicus und in keimenden Erbsensamen.

B. Bestimmungsmethoden.

1. Nach H. D. Dakin und H. W. Dudley[74]).

Dakin und Dudley isolieren die gebildete Oxysäure, indem sie das erhaltene Calciumlactat nach Ausfällung der Proteine mit gesättigter Ammonsulfatlösung im Soxhlet ausäthern. Die nach Verdunsten der ätherischen Auszüge zur Trockne in Wasser aufgenommene Lösung wird teils polarimetrisch, teils acidimetrisch zur Milchsäureidentifikation herangezogen. Aus 1 g Methylglyoxal und 100 ccm 20%igem Leberauszug erhalten Dakin und Dudley dabei Drehungswinkel für α_D von $-0{,}07°$ bis $-0{,}2°$.

Dies ist nicht verwunderlich, da für d(+) Calciumlactat $\alpha_D = +1{,}49°$ ist (ber. für eine 11,3%ige Lösung).

Erst die Überführung in die Zinksalze ergab größere Drehungswinkel. Bestimmung des Kristallwassergehaltes der Salze dienten zur Vervollständigung der Analyse.

---

[72]) P. A. Levene und G. M. Meyer, Jl. Biol. Chem. **14**, 552 (1913).

[73]) C. Neuberg und G. Gorr, Bioch. Zs. **162**, 490, **166**, 482 (1925), **171**, 475 (1926).

[74]) Jl. Biol. Chem. **14**, 423 (1913), und zwar 427—430.

Die acidimetrischen Bestimmungen — Titration der gebildeten Milchsäure mit n/10 Alkalilösung — schwanken sehr[75]).

Während das Verfahren von Dakin und Dudley zur Bestimmung der enzymatisch gebildeten Mandelsäure vorzügliche Dienste leistet, verliert es bei Übertragung auf die Methylglyoxalase erheblich an Wert. Der Hauptnachteil, der sich hier eben bemerkbar macht, ist der an sich kleine Drehungswinkel von $\alpha_D = -2{,}26^0$ für d(−)Milchsäure[76]), resp. ein α_D von $+10{,}00^0$ für das entsprechende Zinklactat[77]).

2. Nach C. Neuberg[78]).

Die Neubergsche Methode besteht in der Einwirkung von Muskel- bzw. Leberextrakt auf Methylglyoxal in Gegenwart von überschüssigem $Ca(HCO_3)_2$, sowie von Spuren Toluol. Das Gemenge bleibt 24 Stunden im Brutschrank unter häufigem Umschütteln stehen. Die Isolierung des gebildeten Ca-Lactats erfolgt mittels Extraktion mit 98%igem Alkohol. Hierbei geht sowohl diejenige Milchsäure (als Lactat) in Lösung, die direkt durch enzymatische Umwandlung aus Methylglyoxal entstanden ist, als auch derjenige Anteil, der ohnedies rein durch Alkaliwirkung auf Methylgloxal sich bildet, außerdem diejenige Menge Calciumsalze, die der Gewebsextrakt in Gegenwart von $Ca(HCO_3)_2$ als solcher produziert.

---

[75]) An Versuchen mit Phenylglyoxal als Substrat machte ich ähnliche Erfahrungen, was wohl an den wechselnden Mengen begleitender ätherlöslicher organischer Säuren aus dem Gewebsextrakt liegt.

[76]) Vgl. Beilstein, Handb. d. org. Chem. 4. Aufl. **III**, 267, sowie E. Jungfleisch und M. Godchot, C. r. **142**, 517 (1906). Wenn 1,2371 g in 100 ccm Lösung sich befinden, erhält man obigen Drehungswinkel. Bei steigender Verdünnung nimmt das spez. Drehungsvermögen ab.

[77]) wenn 1,25 g trockenes Salz in 100 ccm Lösung. Bei steigender Verdünnung steigt hier das spez. Drehungsvermögen.

[78]) Bioch. Zs. **51**, 484 (1913), und zwar 487. Eine Verbesserung des hier kritisierten Verfahrens findet sich erst jüngst bei C. Neuberg und G. Gorr, Bioch. Zs. **171**, 475 (1926), und zwar 480 u. 482.

Durch Kontrollversuche schaltet Neuberg die auf den beiden letzteren Wegen vorgetäuschten Milchsäureteile rechnerisch aus. Das gesamte Calcium wird schließlich als $CaSO_4$ bestimmt.

Zur quantitativen Bestimmung des Lactats muß es mehrmals (4mal) mit Alkohol extrahiert werden, wobei Aufkochen und wiederholtes Einengen eines Volumens von 200 ccm auf 6 ccm bis 10 ccm vonnöten sind. Es sei bemerkt, daß dies bei peinlichster Vorsichtigkeit wohl eine quantitative Trennung des Lactats von den begleitenden anorganischen Calciumsalzen — Calciumchlorid geht natürlich mit in Lösung — zu versprechen scheint, jedoch halten wir diese Operationen — öfters 80° heißes alkalisches Milieu — eine für das unveränderte Methylglyoxal wenig glückliche Atmosphäre. Diese wird durch den entsprechenden Kontrollversuch — Methylglyoxal mit $Ca(HCO_3)_2$-Zusatz ohne Gewebsextrakt — wenig gemildert, denn es ist offensichtlich, daß durch das erstmalige Aufkochen zwar die glyoxalatische Einwirkung aufgehoben, die OH′-Katalyse der Methylglyoxal-Umwandlung gerade gesteigert wird. D. h. es kann nach Beendigung der eigentlichen Versuchszeit im Brutschrank durch die Hitzeaktivierung während der Aufarbeitung die prozentische Umwandlung noch erhöht werden, aber nur auf Grund der OH′-Wirkung. Diese wird im Haupt- und Kontrollversuch als gleich rechnerisch in Abzug gebracht. Es ist aber wahrscheinlich, daß die Kinetik des OH′-Einflusses in der Hitze während einiger Stunden sich bei der im Kontrollversuch noch nahezu vollständig vorhandenen Methylglyoxalmenge wesentlich mehr geltend macht als im Hauptversuch, wo bereits 70—80% umgewandelt sein können.

Was endlich die Kontrollversuche mit reiner zugesetzter Milchsäure betreffen, so bleibt eine Schwankungsbreite von 92 bis 104,2% für die wiedergewonnene Milchsäure. Berücksichtigt man, daß zu diesen 12% Unsicherheit im Endresultat noch 25 bis $33^1/_3$% Abzüge für die nicht enzymatischen Umwandlungen kommen, so kann man im Neubergschen Verfahren keine ge-

nügende quantitative Sicherheit zur Messung der Glyoxalasewirkung erblicken.

Insonderheit dürften die Korrekturabzüge der Grund sein, warum der enzymatisch erreichbare Umwandlungsgrad nur bis zu 76% beobachtet werden konnte.

3. Titrimetrische Verfahren.

Beide vorangehend besprochenen Methoden erfordern verhältnismäßig viel Material und Zeitaufwand, ohne auf besondere Genauigkeit Anspruch zu erheben. Wir haben daher eine titrimetrische Bestimmungsmethode ausgearbeitet, die den Verlauf der Reaktion schnell und sicher zu verfolgen erlaubt. Sie beruht darauf, daß Methylglyoxal als Aldehyd von Hypojodit oxydiert wird, während die entstehende Milchsäure von Hypojodit unter gleichen Bedingungen nicht angegriffen wird. Arbeitet man wie R. Willstätter und G. Schudel[79]) bei der Zuckerbestimmung mit Jod und Natronlauge, so findet neben der Oxydation des Methylglyoxals auch Jodierung statt, und die Werte sind, namentlich in Gegenwart eiweißhaltiger Enzymlösungen, nicht sehr scharf reproduzierbar. Bei Anwendung von Sodabicarbonat und Jod nach F. Auerbach und E. Bodländer[80]) wird zwar Jodierung vermieden, das Ergebnis ist aber immer noch unbefriedigend. Erst die in Kap. V, B, 2, c_1 beschriebene Abänderung dieses Verfahrens hat es gestattet, die Reaktion so zu leiten, daß von 1 Mol Methylglyoxal genau 1 Atom O aufgenommen und eine sichere Bestimmung möglich wird.

Ein Verbrauch von 1 ccm n/10 Jodlösung entspricht 3,60 mg Methylglyoxal. Bei Anwendung von 20 mg Substrat und Berücksichtigung des Reduktionswertes der Enzymlösung kann man den in Milchsäure übergegangenen Betrag mit einer maximalen Ungenauigkeit von $\pm 2{,}5\%$ ermitteln. Durch Bestimmung der ge-

---

[79]) R. Willstätter und G. Schudel, Chem. Ber. **51**, 780 (1918).
[80]) Zs. ang. Chem. **36**, 602 (1923).

bildeten Milchsäure nach O. v. Fürth und D. Charnass[81]), wobei 1 Mol Methylglyoxal nur etwa 0,08 Mole Aldehyd lieferte, ließ sich beweisen, daß die in Reaktion getretene Menge des Methylglyoxals, die sich aus der Differenz der jodometrischen Titration berechnen läßt, ausschließlich in Milchsäure übergegangen ist[82]).

C. Wesen und Wirkung des Enzyms.

Die Wirkungsbedingungen der Methylglyoxalase und die Kinetik der Milchsäurebildung sind noch kaum Gegenstand der Untersuchung gewesen. Da auch bei anderen Aldehydmutasen in dieser Richtung nur vereinzelt zuverlässige Beobachtungen vorliegen, werde ich versuchen, die reaktionskinetische Eigenart der Glyoxalase durch einen Vergleich mit anderen genauer untersuchten Enzymen hervortreten zu lassen. Die Versuche, die mir dabei zur Grundlage dienen, sind vorwiegend mit Enzymlösungen aus Schweineleber ausgeführt worden. Als Substrat benützte ich neben Methylglyoxal auch Phenylglyoxal, dessen Umwandlung in Mandelsäure polarimetrisch verfolgt wurde.

Das pH-Optimum für die Dismutation des Methylglyoxals ist verhältnismäßig breit und liegt um pH = 7,5 (30°), in naher Übereinstimmung mit dem Wasserstoffexponenten des Blutes. Bei geringeren Aciditäten nimmt die Wirksamkeit des Enzyms nur langsam, bei größeren ziemlich rasch ab. Bei pH = 5,5 ist nur noch etwa die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit vorhanden. Bei pH = 4 findet keine Umwandlung mehr statt. Für die Reaktion Phenylglyoxal → Mandelsäure fand ich eine etwas geringere Wasserstoffionenkonzentration optimal, nämlich $6 \cdot 10^{-9}$ und einen rascheren Abfall im sauren Gebiete als bei der Milch-

[81]) Bioch. Zs. **26**, 199 (1910).

[82]) Ein Vergleich mit dem Verfahren O. Warburgs, das in den Untersuchungen von O. Warburg, K. Posener und E. Negelein (Bioch. Zs. **152**, 309 [1924], **164**, 481 [1925]) und von O. Meyerhof (Bioch. Zs. **159**, 432 [1925]) zur Bestimmung der Glyoxalase angewandt wurde, steht aus.

säurebildung. Das pH-Optimum ist auch hier ein breites. Es erstreckt sich von pH = 7,5 bis pH = 9. Bei pH = 5,5, wo Methylglyoxal noch mit der Hälfte der maximalen Geschwindigkeit reagiert, wird keine Mandelsäure mehr gebildet.

Der Unterschied der pH-Kurven für die beiden Substrate[83]) braucht nicht im Sinne einer Verschiedenheit von Methyl- und Phenylglyoxalase gedeutet zu werden. Dieser Schluß wäre nur dann berechtigt, wenn die Aciditätsfunktion allein durch den Einfluß der H-Ionen auf das Ferment bestimmt würde. Die Untersuchungen an zucker- und eiweißspaltenden Enzymen haben jedoch gelehrt, daß der Verlauf der pH-Kurven sehr wahrscheinlich von der Natur der Enzym-Substratverbindungen abhängt, und daß diese bald vorwiegend durch die elektrochemischen Eigenschaften des Ferments (Saccharase), bald vorwiegend durch jene des Substrates (Proteasen) bestimmt wird[84]). Bei der Disproportionierung der Keto-aldehyde könnte das Ergebnis ähnlich wie bei der Einwirkung der β-Glucosidase des Emulsins auf verschiedene β-Glucoside[85]) von der Art des Substrates abhängen, auch ohne daß dieses entschieden saure oder basische Eigenschaften aufweist.

Zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit wurde direkte Proportionalität beobachtet. Man findet also in diesem Punkte bei der Glyoxalase dasselbe einfache Verhalten, das für die Mehrzahl der Carbohydrasen zutrifft und deren quantitative Bestimmung im Gegensatz zu der gewisser Proteasen wesentlich vereinfacht.

Die Abhängigkeit von der Substratkonzentration ist für Methyl- und Phenylglyoxal wesentlich verschieden. Im ersten Falle ist der in der Zeiteinheit erzielte Umsatz herunter bis zu 0,005 n-Lösungen von der Menge des angewandten Substrates

---

[83]) Die pH-Abhängigkeit von Milchsäure- und Mandelsäurebildung ist nicht mit ein und derselben Enzymlösung bestimmt worden.

[84]) R. Kuhn in Opp., D. Ferm. S. 203.

[85]) R. Willstätter und G. Oppenheimer, H. **121**, 183 (1922); R. Willstätter, R. Kuhn und H. Sobotka, H. **129**, 33 (1923); vgl. dagegen K. Josephson, Chem. Ber. **59**, 821 (1926).

nahezu unabhängig. Im zweiten Falle nimmt die Menge der entstehenden Mandelsäure mit Erhöhung der Phenylglyoxal-Konzentration stark zu. Versucht man aus den vorliegenden Messungen unter der Annahme, daß die Reaktionsgeschwindigkeit ein Maß für die Konzentration (Aktivität) der Enzym-Substratverbindung darstellt, auf die Lage des Gleichgewichts zwischen Glyoxalase und Methylglyoxal zu schließen, so ergibt sich für die Dissoziationskonstante dieser Verbindung

$$K_{M.\,Gl.} = \frac{[\text{Glyoxalase}] \times [\text{Methylglyoxal}]}{[\text{Glyoxalase} - \text{Methylglyoxal}]}$$

ein Wert < 0,005, einer Affinitätskonstante von über 200 entsprechend. Affinitäten von dieser Größenordnung sind bei enzymatischen Reaktionen noch nicht beobachtet worden. Nur einige esterspaltende Enzyme scheinen, soweit sich dies auf Grund älterer Literaturangaben beobachten läßt[86]), hierin der Glyoxalase nahezukommen.

Den höchsten Wert für $1/K_S$, der bisher bei allen Enzymen gemessen wurde[87]), erreichte ein Autolysat der Brennereihefe Rasse XII mit $1/K_S = 63$, was einer Dissoziationskonstante von 0,016 für die entsprechende Invertin-Rohrzuckerverbindung gleichkommt.

Von der ungleichen Abhängigkeit von der Substratkonzentration gilt dasselbe, was von der Verschiedenheit der pH-Kurven gesagt wurde. Die große Affinität zum Methylglyoxal und die vielfach geringere zum Phenylderivat erachte ich nicht als Beweis für das Vorhandensein zweier verschiedener Enzyme. Es ist in Untersuchungen aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften bereits mehrfach dargelegt worden, daß ein und dasselbe Enzym zu verschiedenen Substraten stark differierende Affinitäten aufweisen kann[88]).

---

[86]) R. Kuhn in Opp., D. Ferm. I. S. 234.

[87]) R. Kuhn, H. **125**, 28 (1922/23), und zwar 52/53; siehe auch bei Opp., D. Ferm. S. 188.

[88]) R. Kuhn, H. **125**, 1, 28 (1922); R. Willstätter, R. Kuhn und H. Sobotka, H. **129**, 33 (1923), **134**, 224 (1923/24).

Unmittelbare Anhaltspunkte für die Identität von Methyl- und Phenylglyoxalase besitzen wir noch nicht.

Die intramolekulare Cannizzaro-Reaktion, die das Methylglyoxal unter dem Einflusse der Leberauszüge erleidet, verläuft vollständig. Wir konnten wiederholt Umwandlungen von 99 bis 100% feststellen, im Gegensatz zu C. Neuberg[89]), der nur etwa 76% Umsatz erzielte[90]). Kommt die Reaktion früher zum Stillstand, was auch bei unseren Versuchen vielfach eintrat, so hat dies in der Einstellung eines „falschen Gleichgewichts" oder in Enzymzerstörung seine Ursache. Für die von H. D. Dakin und H. W. Dudley[91]) erwogene Reversibilität des Vorganges, für die Einstellung eines echten Gleichgewichts

$$\text{Methylglyoxal} + \text{Wasser} \rightleftarrows \text{Milchsäure},$$

das den enzymatischen Gleichgewichten bei der Hydrolyse bzw. Synthese von Estern, Glucosiden und Disacchariden analog wäre, konnten keinerlei Anhaltspunkte gefunden werden. Jedenfalls liegt das Gleichgewicht in den verdünnten Lösungen, mit denen wir arbeiten, so sehr auf Seite der Milchsäure, daß es sich dem analytischen Nachweis entzieht.

Beim Phenylglyoxal betrug die Mandelsäurebildung im günstigsten Falle etwa 50%, wobei 25% auf linksdrehende, 25% auf racemische Säure entfielen. Einen echten Gleichgewichtszustand scheint es aber auch hier nicht zu geben, denn bei der Einwirkung des Enzyms auf Mandelsäure ließ sich das Auftreten von Phenylglyoxal nicht nachweisen. Es trat auch keine optische Aktivierung der Mandelsäure ein. Die Menge der Mandelsäure blieb unverändert.

---

[89]) Bioch. Zs. **51**, 484 (1913). Mit milchsäurebildenden Bakterien ist C. Neuberg und G. Gorr, Bioch. Zs. **162**, 490, **166**, 482 (1925) die vollständige Umwandlung von Methylglyoxal in d,l-Milchsäure gelungen.

[90]) O. Meyerhof erreichte kürzlich mit Extrakt aus Gehirnsubstanz (Ratte) einen mehr als 75%igen Umsatz von m/100—m/200 Methylgl.-Lösg. in einer Stunde bei 38°. Bioch. Zs. **159**, 432 (1925).

[91]) Jl. Biol. Chem. **14**, 155, 423 (1913), und zwar 424.

Unter Berücksichtigung der reaktionskinetischen Verhältnisse leite ich, einem Vorschlage von R. Willstätter und R. Kuhn[92]) folgend, für die Ausbeute und für die Konzentration an Glyoxalase nachstehende Maße ab:

1 Glyoxalase-Einheit (Gl.E.) entspricht der Enzymmenge, die bei pH = 7,5 und 30° in 60 Minuten 10 mg Methylglyoxal, die in 10 ccm Reaktionsgemisch enthalten sind, zu 25% in Milchsäure verwandelt. Die Beziehung zwischen Zeit und Umsatz wird einer empirischen Kurve (Fig. 4) entnommen. Der Glyoxalase-Wert (Gl.W.) gibt die in 1 g Trockensubstanz vorhandene Anzahl von Enzym-Einheiten an.

In Wirklichkeit wird vielfach nicht mit 10 ccm Reaktionsvolumen und auch nicht mit der angegebenen Substratkonzentration gearbeitet. Die Umrechnung auf obige Bedingungen gestaltet sich dann wie folgt: 10 ccm Enzymlösung + 5,0 ccm Methylglyoxallösung (21,0 mg enthaltend) + 5 ccm m/5 Phosphatgemisch vom pH = 7,5. Nach 20 Stunden ergab die jodometrische Bestimmung einen Umsatz von 50,0%.

Das Reaktionsgemisch enthielt zu Beginn 21,0 mg in 20 ccm = 0,105% Substrat. In einer 0,100%igen Methylglyoxallösung, wie sie die Definition verlangt, wären auf Grund der Beziehung zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit $50{,}0 \cdot \frac{105}{100} = 52{,}5\%$ Umsatz gefunden worden. Für die Zeit 25%-igen Umsatzes berechnen wir daraus nach Fig. 4) $20 \cdot \frac{72}{345} = 4{,}18$ Stunden. Da überdies das Produkt Enzymmenge × Reaktionsdauer konstant ist, folgt, daß $\frac{1}{4{,}18} = \mathbf{0{,}24}$ Gl.E. zur Erreichung des beobachteten Umwandlungsgrades in der gegebenen Zeit notwendig sind. Im vorgeschriebenen Reaktionsvolumen von 10 ccm waren 5 ccm Enzymlösung vorhanden. In 100 ccm dieser Lösung sind daher $20 \cdot 0{,}24 = \mathbf{4{,}8}$ Gl.E. enthalten. Da 10 ccm 0,262 g

---

[92]) Chem. Ber. **56**, 509 (1922/23).

Trockensubstanz enthielten, beträgt der Gl.W. des Enzyms in der Lösung **1,84.**

Gl.E. und Gl.W., die zur Kontrolle der Enzymdarstellung dienen, sind Maße für die Ausbeute an Wirksamkeit und für die Wirksamkeit pro Gramm Trockengewicht. Es sind aber nicht Maße für die Menge des Enzyms wie etwa Saccharase-Wert und Saccharase-Einheit. Änderungen der enzymatischen Aktivität und Veränderlichkeit der Kinetik, die bei der Saccharase nur ausnahmsweise und in verhältnismäßig geringem Ausmaße beobachtet wurden[93]), nach einer Untersuchung von R. Willstätter und E. Baumann[94]) bei der Maltase bereits in den Vordergrund treten, sind für die Glyoxalase überaus kennzeichnend. Die stärksten Aktivitätsänderungen beobachten wir bei der Dialyse, durch die wir z. B. das Doppelte und mehr der angewandten Gl.E. erhalten. Die Unterschiede der Kinetik, bei denen allerdings schon Enzymzerstörung mitspielt, sind mitunter so groß, daß die Gestalt der Zeit-Umsatzkurven gänzlich verändert erscheint. Aus diesem Grunde wäre für jede einzelne Enzymlösung der zeitliche Verlauf der Milchsäure- und Mandelsäurebildung zu ermitteln und der Berechnung zugrunde zu legen. Da dies in der vorliegenden Untersuchung noch nicht geschehen ist, haben die Wirksamkeitsvergleiche, die ich zwischen verschiedenen Lösungen ziehe, nur orientierenden Charakter. Auch das Geschwindigkeitsverhältnis, in dem Methyl- und Phenylglyoxal angegriffen werden, läßt sich nur der Größenordnung nach angeben. Es beträgt etwa 1:10 zugunsten des Methylglyoxals (ber. für die Zeiten 25%igen Umsatzes in 0,015 n-Lösung bei optimalem pH und 30°).

D. Glykolyse und Milchsäurebildung.

Vergleichen wir die Milchsäurebildung aus Methylglyoxal mit der Milchsäurebildung aus Kohlehydrat im Blute und im Gewebe,

---

[93]) R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn, H. **123**, 1 (1922), und zwar 63; R. Willstätter, K. Schneider und E. Wenzel, H. **151**, 1 (1925/26).

[94]) H. **151**, 242 (1925/26), und zwar 251.

so ergibt sich, daß die reaktionskinetischen Verhältnisse mit der Annahme des intermediären Auftretens von Methylglyoxal bei der Glykolyse durchaus vereinbar sind. O. Warburg, K. Posener und E. Negelein[95]), sowie O. Meyerhof[96]) haben bereits gefunden, daß normales Gewebe, z. B. Leber, Methylglyoxal unter gleichartigen Bedingungen erheblich rascher in Milchsäure verwandelt als Traubenzucker. Die Geschwindigkeit der Glykolyse wird also nicht durch die Geschwindigkeit der Disproportionierung des Ketoaldehyds limitiert. Meine Beobachtungen ergänzen diese Feststellung hinsichtlich der Abhängigkeit beider Reaktionen von der Substratkonzentration und von der Acidität. Das breite optimale H-ionen-Gebiet der Glyoxalase um pH = 7,5 entspricht den Erfahrungen bei der Glykolyse, für die P. Rona und G. G. Wilenko[97]) pH = 7,52 (im Blute), K. Fukushima[98]) pH = 7,76 am günstigsten fanden, sowie den Messungen von O. Warburg, K. Posener und E. Negelein[99]), die in Kohlensäure-Bicarbonat-Gemischen stetige Zunahme der Milchsäurebildung beim Übergang von pH = 6,7 auf pH = 7,8 ergeben[99a]). Die Glyoxalase, die bei pH = 6 noch deutlich wirksam ist, läßt der Glykolyse, die hier bereits verschwindet, auch noch bei größerer als der optimalen Acidität genügend Spielraum frei. Ebenso wird die außergewöhnlich große Affinität des Enzyms zum Methylglyoxal der Abhängigkeit der Glykolyse von der Menge zugesetzter Glucose[100]) in einfacher Weise gerecht.

---

[95]) Bioch. Zs. **152**, 309 (1924).

[96]) Bioch. Zs. **159**, 432 (1925).

[97]) Bioch. Zs. **62**, 1 (1914).

[98]) Jl. of Biochem. **2**, 447, 455 (1923).

[99]) l. c. 95.

[99a]) Für das von der Muskulatur abtrennbare Ferment der Milchsäurebildung aus Glykogen und Stärke fand O. Meyerhof ein pH von etwa 7,4 optimal. Naturw. **14**, 196 (1926).

[100]) l. c. 95.

III. Kapitel.

Zur Theorie der Oxydoreduktion.

A. Das Cannizzaro-System.

Die Beschäftigung mit oxydo-reduzierenden Fermenten läßt es gerechtfertigt erscheinen, die Theorie der Oxydoreduktion[101]) kurz zu streifen.

Die Oxydoredukasen repräsentieren eine Gruppe der sogenannten Desmolasen[102]), der eigentlichen Stoffwechselfermente. Wesen und gemeinsamer Inhalt aller Vorgänge im Kohlehydratabbau besteht in einer Loslösung der C — C-Bindungen des Kohlenstoffskeletts zum Zwecke der Nutzbarmachung der im Organismus aufgespeicherten Energie. Neuberg und Oppenheimer stellen die stoffliche Aufteilung über die energetische und subordinieren daher alle Prozesse einer Desmolyse[103]). Den Oxydoredukasen weisen sie eine wesentliche Teilaufgabe in dem Gebiete zu. Ihre Funktion soll in Kraft treten, wenn die — bisher noch unbekannten — Fermente „des ersten Angriffs" das Sechs-Kohlenstoffgerüst vorbereitend bis zur C_3-Reihe zergliedert haben.

---

[101]) Vgl. insbesondere die ausgezeichnete Darstellung in Oppenheimer-Kuhn, Die Fermente und ihre Wirkungen, Leipzig 1924/26, **XVII.** Hauptteil, §§ 695, 696, 702 u. 718; ferner bei H. D. Dakin, Oxidation and reduction in the animal body, London 1922.

[102]) C. Neuberg und C. Oppenheimer, Zur Nomenklatur der Gärungsfermente und Oxydasen, Bioch. Zs. **166**, 450 (1925).

[103]) Ursprünglich plante C. Oppenheimer als Überschrift für die Klasse der Stoffwechselfermente den Namen: Katenergasen. Hiermit sollte zum Ausdruck gebracht werden, daß mit der Wirkung dieser Fermente hauptsächlich eine Verminderung chemischer Potentiale einhergehe; Privatmitteilung von R. Kuhn, siehe auch Korrekturbogen von Opp., D. Ferm.

An die Wirkung der Oxydoreduktasen schließt sich ein kombiniertes Ineinandergreifen von Carboxylasen, Katalasen und Carboligasen bis zur völligen Verbrennung zu CO_2 und H_2O bzw. C_2H_5OH und CO_2.

Die Oxydoredukasen vermitteln also zwischen den Hexasen und den Enzymen der letzten Abbaustufen.

Die Verschmelzung von Oxydation und Reduktion im biologischen Geschehen führte schon M. Traube in einer Polemik gegen Hoppe-Seyler näher aus[104]). Er schrieb: „Es gibt Fermente, die die Fähigkeit besitzen, auf der einen Seite Reduktion, auf der anderen Oxydation und auf diese Weise einen Platzwechsel, eine Wanderung des Sauerstoffs zu bewirken." J. E. Abelous[105]) führte den Namen Oxydo-Reduktase für ein Ferment ein, das die Oxydation von Aldehyden durch Nitrate und Chlorate katalytisch zu beschleunigen vermochte.

Das Wesen eines gleichzeitig oxydo-reduzierenden Vorgangs zeigt sich uns am klarsten bei der Cannizzaro-Reaktion der Aldehyde. Unter Wasseraufnahme werden dabei bekanntlich 2 Mol Aldehyd zu 1 Mol Säure und 1 Mol Alkohol dismutiert.

$$\begin{array}{l} R\cdot CHO \\ R\cdot CHO \end{array} \quad \begin{array}{c} H_2 \\ + \\ O \end{array} \quad \longrightarrow \quad \begin{array}{l} R\cdot CH_2OH \\ R\cdot COOH \end{array}$$

Enzymatisch vollziehen diese Reaktionen die Aldehydrasen von Parnas[106]), Batelli und Stern[107]), was an den klassischen Beispielen Salicylaldehyd, Benzaldehyd und Acetaldehyd bewiesen wurde. Nach der Wielandschen Auffassung vom Oxydationsmechanismus fungiert hierbei ein Mol Aldehyd als Acceptor für Wasserstoff, der von dem zweiten Mol Aldehyd (Donator) geliefert wird. Mithin ein Molekül Aldehyd dehydriert das zweite.

$$\begin{array}{l} R\cdot CH\begin{array}{l}/OH \\ \backslash OH\end{array} \quad -H_2 = R\cdot COOH + H_2 \cdots \text{Acc.} \\ R\cdot CHO + H_2 \quad = R\cdot CH_2OH \end{array}$$

---

[104]) Chem. Ber. **10**, 1984 (1877), und zwar 1986.

[105]) C. r. **136**, 1573 (1903).

[106]) J. Parnas, Bioch. Zs. **28**, 274 (1910).

[107]) F. Batelli und L. Stern, C. r. soc. biol. **68**, 742 (1910); Bioch. Zs. **29**, 130 (1910).

Einen Spezialfall dieser Erscheinung haben wir bei der Disproportionierung Methylglyoxal → Milchsäure vor uns. Dehydrierung und Hydrierung setzen am selben Molekül ein.

$$\begin{array}{l} CH_3 \cdot CO \cdot CHO \\ \quad + H_2\ O \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} CH_3 \cdot CH(OH) \cdot C(=O) - OH \end{array}$$

Diese Art Wasseraufnahme, die von der Glyoxalase Dakins — Neubergs Ketonaldehydmutase — begünstigt wird, ist der Prototyp eines „inneren Cannizzaro“[108]).

Bedienen wir uns des allgemeinen Schemas der Dehydrierungs-Theorie

$$\text{Don.} \cdots H_2 + \text{Acc.} + \text{Katalys.} \rightarrow \text{Don.} + \text{Acc.} \cdots H_2 + \text{Katalys.},$$

so scheint theoretisch der vorliegende Fall nur so plausibel, daß im Methylglyoxal zwei wirksame Gruppen sind, deren eine als Donator leicht abspaltbaren aktivierten Wasserstoff spendet und mit Hilfe des Katalysators — der Glyoxalase — die andere Carbonylgruppe als Acceptor den Wasserstoff wieder aufnimmt. Primär addiert zweifellos sich Wasser an eine der beiden Carbonylgruppen, wobei dann in Gegenwart des Ferments ein Platzwechsel des Wasserstoffs eintritt.

So offenbart sich denn der Inhalt der Wielandschen Dehydrierungstheorie als „das Prinzip der enzymatischen Wasserstoffverschiebung“[109]).

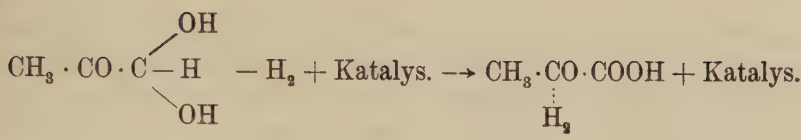
Im folgenden Formelbild:

$$CH_3CO \cdot CHO + H_2O = CH_3 \cdot CO \cdot C(OH)(OH) - H$$

---

[108]) Diese Deutung verdanken wir C. Neuberg. Besonders studiert wurde sie von H. D. Dakin (Jl. Biol. Chem. **18**, 91 [1914]), K. Josephson und H. v. Euler (H. **135**, 49 [1924]), von S. Kostytschew (H. **89**, 367 [1914]) und von Neuberg. Eulers Versuche bestätigen, „daß in der Hefe ein Enzym existiert, welches die Cannizzaro-Bildung der Aldehyde bewirkt“.

[109]) Chem. Ber. **55**, 3646 (1922).



findet dies seinen Ausdruck.

Die vielen möglichen Hydratformen des Methylglyoxals unterstützen diese Vorstellung. Der Ketoaldehyd selbst kann dabei nicht die Rolle eines Katalysators übernehmen, denn er verschwindet als Oxysäure aus der Reaktion.

Die Erklärung der Disproportionierung im Sinne der Oxydationstheorie von Traube-Bach oder nach O. Warburg, was an sich wohl durchführbar wäre, scheint mir für unseren Spezialfall etwas abliegend. Besonders bei der Verwandlung der Aldehydhydrate ist ja die Wielandsche Auffassung vom Oxydationsmechanismus am meisten gefestigt.

Aldehydrase und Glyoxalase sind nicht identisch. Dakin[110]) stellte dies durch Auffindung der Antiglyoxalase sicher, die nur die glyoxalatische Wirkung hemmt, während sie auf Aldehydrase ohne Einfluß ist.

Diesen biologischen Prozessen verwandt scheint die jüngst mitgeteilte Reduktion von Aldehyden und Ketonen in absolutem Alkohol mittels Aluminiumäthylat[111]). Es zeigte sich, daß zunächst Addition von Aldehyd und Alkoholat eintritt und dann Spaltung in Aldehyd und neuen Alkohol. Die Verfasser schließen daraus, daß die Reduktion kein gekoppelter Dehydrierungs- und Hydrierungsvorgang im Sinne Wielands ist, sondern, daß lediglich eine Vereinigung der Komponenten unter Bildung von Aldehyd- oder Ketonalkoholaten stattfindet, und dann wiederum eine Spaltung in anderer Richtung Platz greift.

Im Ablaufe des Zellgeschehens treten die echte Cannizzaro-Reaktion, glatte Dehydrierung und die Hydratisierung des Methylglyoxals in scharfe Konkurrenz. Ausschlaggebend scheint dabei

---

[110]) H. D. Dakin und H. W. Dudley, Jl. Biol. Chem. **15**, 463 (1913).
[111]) H. Meerwein und R. Schmidt, A. **444**, 221 (1925).

die wechselnde Hydrierungsaffinität des vorhandenen Acceptors und die Affinität Katalysator—Substrat zu sein. Hierin scheint wohl der tiefere Sinn dafür zu liegen, daß uns die tierische Zelle CO_2 und H_2O als Endprodukte der Verbrennung, die pflanzliche C_2H_5OH und CO_2 liefert. Es ist heute als sicher anzunehmen, daß die Wege, die zu dem verschiedenartigen Schlusse des Abbaues führen, bei der C_3-Stufe sich bereits trennen. Im animalischen Milieu steht die Hydratisierung des Methylglyoxals zur Milchsäure im Vordergrund infolge der enormen Affinität der Glyoxalasen zum Substrat, bei der alkoholischen Gärung der Hefe dagegen bestimmt die gemeinsame Dismutation von Methylglyoxal und Acetaldehyd und die direkte Dehydrierung des Ketoaldehyds zur Brenztraubensäure die weitere Entwicklung. Für einen echten Cannizzaro und nicht für eine einfache Hydratisierung in unserem Falle spricht der Umstand, daß der Prozeß entgegen früheren Anschauungen irreversibel ist, ein Nachweis, der in vorliegender Untersuchung erbracht werden konnte. Eine Reversibilität des Vorganges, die Dakin mittels p-Nitrophenylhydrazin nachgewiesen zu haben glaubte, würde sonst gegen einen echten Cannizzaro sprechen. Die Dakinsche Anschauung, die Oppenheimer[112]) noch als Stütze für eine Hydratisierung ins Feld führt, ist damit aufzugeben.

In einer Arbeit betitelt „Über die Nichtexistenz einiger Fermente" behauptet S. Kostytschew[113]), daß zwischen einfacher und gemischter Cannizzaro-Reaktion keine scharfe Grenze zu ziehen sei. Er stützt sich dabei auf die Versuche von F. F. Nord[113a]), bei denen Kostytschew den Nachweis eines gleichzeitigen Verlaufes von einfachen und gemischten Cannizzaro-Reaktionen durch Einwirkung von Hefe auf zwei verschiedene Aldehyde geführt wissen will.

Kostytschew schließt daraufhin, daß bei der Neubergschen dritten Vergärungsform die Bildung von nur zwei Pro-

---

[112]) Opp., D. Ferm. § **865** S. 1551.

[113]) S. Kostytschew, H. **154**, 262 (1926).

[113a]) F. F. Nord, Bioch. Zs. **106**, 275 (1920).

dukten bei der gemeinsamen Dismutation von Methylglyoxal und Acetaldehyd, nämlich das Entstehen von Brenztraubensäure und Äthylalkohol, ohne besondere regulierende Einrichtungen unverständlich sei.

Zunächst sei betont, daß die Nordschen Experimente von Kostytschew in einem irreführenden Lichte interpretiert worden sind. Nord erreichte (in der von K. zitierten Arbeit) lediglich die gekreuzte Dismutation von zwei verschiedenen Aldehyden, z. B. Acetaldehyd und Iso-valeraldehyd, durch Kondensation mittels Aluminiumäthylat unter starker Eiskühlung, also ohne Hefe.

Entgegen Kostytschew müssen wir annehmen, daß es ein völlig wesensfremder Vorgang ist, ob ein Ferment eine inter- oder eine intra-molekulare Reaktion katalysiert. Allein eine Identität des die echte Cannizzaro-Reaktion bewirkenden Fermentes von Batelli und Stern und der Glyoxalase Dakins (Neubergs Ketonaldehydmutase) ist undenkbar. Es müßte — Kostytschews Ansicht als richtig gesetzt — bei der Dismutation von Methylglyoxal in Milchsäure außerdem noch die parallele Bildung von Brenztraubensäure und Acetol erwartet werden. Da dies aber — für die tierische Zelle z. B. — nicht zutrifft, müssen wir für das Wechselspiel der einfachen und gemischten Cannizzaro-Reaktion besondere regulierende Vorrichtungen [113b]) annehmen. Es entsteht, wie in vorliegender Untersuchung des öfteren beobachtet wurde, bei Einwirkung des glyoxalatischen Ferments bis zu 100% Milchsäure aus Methylglyoxal. Wir können weiter entgegen Kostytschew sogar annehmen, daß die enzymatischen Katalysatoren in ihrem Wirkungsmechanismus so fein differenziert zu sein scheinen, daß es bereits fraglich erscheint, ob die Dismutation von Methylglyoxal und Phenylglyoxal wirklich von ein und demselben Ferment vollzogen wird [113c]).

Auf den Versuch Kostytschews, daß Aldehydmutase, Hefereduktase, Carboxylase und Carboligase identisch seien und durch ein einziges Ferment

[113b]) z. B. Antiglyoxalasewirkung; s. auch die Erklärung auf S. 36.

[113c]) Siehe darüber ausführlicher in Kap. II C. S. 26 u. 27.

— das ganz allgemein Verschiebungen der Wasserstoffatome und der einwertigen Radikale in einer Kohlenstoffkette auslöse — ersetzbar sind, sei hier nur verwiesen. Weder ein Experiment noch ein theoretischer Analogiefall spricht für die Annahme eines solchen Ferments.

B. Das Schardinger-Modell.

Für die Aufklärung der Oxydoreduktion hat das Schardinger-Enzym wichtige Dienste geleistet. Schardinger[114]) fand vor nahezu 25 Jahren, daß frische Milch bei 70° ein Gemisch von Formaldehyd und Methylenblau zu entfärben vermöge. Mit gekochter Milch blieb der Effekt aus. Die zuerst vermutete Bakterienwirkung wurde von Trommsdorf[115]) widerlegt, da das Experiment auch mit steriler Milch gelang. Das Schardinger-Enzym ist eine typische Dehydrase. Der Farbstoff Methylenblau ist der Acceptor für den vom Aldehyd gespendeten Wasserstoff. Es ist bereits vielfach dargelegt worden[116]), daß sowohl der Formaldehyd als auch Methylenblau durch andere Aldehyde bzw. Farbstoffe ersetzt werden können.

Versuche haben uns davon überzeugt, daß auch Methylglyoxal den Formaldehyd hierbei zu vertreten vermag.

25 ccm einer frischen ungekochten Kuhmilch[117]) mit 1 ccm 0,4%iger Methylglyoxallösung und einigen Tropfen wäßriger Methylenblau-Lösung zeigte nach kurzem Anwärmen auf 50° eine wesentlich schnellere Entfärbung des Farbstoffs gegenüber dem Parallelversuch mit gekochter Kuhmilch.

Dies scheint von Interesse, nachdem Harden und Norris[118]) im Modellversuch bei Trockenhefe Methylglyoxal unwirksam fanden. Außerdem stützt dieses Beispiel die Auffassung

---

[114]) Zs. Unters. Nahrungs-Genußmittel **5**, 22 (1902); Chem.-Ztg. **28**, 1113 (1908).

[115]) Zentralbl. Bakt. **49**, 291 (1909).

[116]) W. Rullmann, Bioch. Zs. **32**, 446 (1911); ferner P. H. Römer, Bioch. Zs. **40**, 5 (1912).

[117]) Ausführung nach L. Gattermann-H. Wieland, Die Praxis d. org. Chemikers 19. Aufl. S. 196, Berlin u. Leipzig 1925.

[118]) A. Harden und R. V. Norris, Biochem. Jl. **9**, 330 (1915).

einer direkten Dehydrierung von Methylglyoxal zu Brenztraubensäure. Wieland verdanken wir den Identitätsnachweis, daß Oxydase, Reduktase und Mutase mit der in der Milch vorhandenen Dehydrase sich decken[119]). Bach nimmt allerdings dagegen Stellung[120]). Mit nach Sbarsky und Michlin aus frischer Buttermilch gewonnenem Enzym wird nachgewiesen, daß die Oxydasefunktion des Systems (in Gegenwart von O_2 Zuwachs an Salicylsäure) nicht enzymatischer Natur sei, sondern wahrscheinlich auf Begleitstoffe in der Milch (lipoider Natur?) zurückzuführen sei, die als primäre Wasserstoffacceptoren fungieren.

Neuerdings beobachtete auch A. Lebedew[121]), daß Methylglyoxal — allerdings 30 mal schwächer als Glycerinaldehyd — durch Oxydoreduktase in Gegenwart von Methylenblau dehydiert werden kann.

Aufgabe und Bedeutung der Oxydoredukasen stellt sich folgendermaßen dar:

Für das tierische Reich ermöglichen sie den Abschluß der anaeroben Phase, im pflanzlichen Leben leiten sie das aerobe Geschehen ein, indem sie die Kohlensäure in Form der Ketonsäuren den terminalen Stoffwechselfermenten zugänglich machen.

---

[119]) H. Wieland, Chem. Ber. **47**, 2085 (1914), und zwar 2088.

[120]) A. Bach und K. Nikolajew, Bioch. Zs. **169**, 105 (1926).

[121]) Bioch. Zs. **169**, 501 (1926). Nach A. Lebedew kann man eine Oxydoreduktase im Hefemacerationssaft durch Niederschlagen mit Ammonsulfat von begleitenden Kofermenten trennen (H. **156**, 153 [1926]).

IV. Kapitel.

Hilfsstoffe des Kohlehydratumsatzes.

Einführung.[122])

Gegen Ende der 80iger Jahre des vorigen Jahrhunderts erregte ein der Pariser Société de Biologie vorgelegter Bericht von E. Brown-Séquard[123]) ungeheures Aufsehen. Es war ihm gelungen, durch Injektion von Hodenextrakten sich selbst zu verjüngen. Dies Experiment erweckte den Glauben an die Vorstellung, daß im Organismus Zellen vorhanden sein müssen, deren ins Blut ergossene Sekrete andere Organe weitgehend beeinflussen können. Die alte Lehre Cl. Bernards von einer „Sécrétion externe" und einer „Sécrétion interne" fand ihre praktische Bestätigung. Nach einem Vorschlage von W. M. Bayliss und E. H. Starling[124]) nannte man die Produkte der endokrinen Drüsen, die via Blut und Lymphe eine so funktionelle Wirkung auf weit entfernt liegende Zellen auszuüben vermochten, Hormone. Ihre Bedeutung für den Organismus gleicht der des zentralen Nervensystems. Ohne sie scheint der Lebensablauf nicht mehr verständlich.

Von der stattlichen Zahl der uns heute bekannten Hormone besitzen für den intermediären Kohlehydratstoffwechsel die

---

[122]) Über Theorie und Mechanismus der inneren Sekretion vgl. die Werke von A. Biedl, Innere Sekretion, Berlin u. Wien, 4. Aufl. (1922); A. Weil, Innere Sekretion, Berlin, 3. Aufl. (1923); ferner L. Landois-R. Rosemann, Lehrbuch der Physiologie d. Menschen 18. Aufl. S. 457 ff. (1923).

[123]) E. Brown-Séquard, Sitzung der Pariser Société de Biologie v. 1. Juni 1889, C. r. soc. biol. 415, 420, 430 u. 451 (1889).

[124]) Jl. of Physiol. **28**, 325 (1902); E. P. **5** (1906).

inneren Sekrete der Nebenniere und des Pankreas, das Adrenalin und das Insulin, besondere Geltung. Man erkannte frühzeitig die antagonistische Korrelation dieser beiden Stoffe. Das regulierende Ineinandergreifen mit dem Nervensystem war damit zugleich festgelegt. Denn Adrenalinwirkung steigerte sich bei Reizung des nervus sympathicus, was sich in größerer Nierendurchlässigkeit für Zucker, also schließlich in Glucosurie ausdrückte. Der Zuckerstich von Cl. Bernard, seine bekannte „piqûre“[125]), nämlich die Verletzung des Bodens des vierten Ventrikels, endete ebenfalls mit raschem Glykogenabbau und führte zu Hyperglykämie und Glucosurie, eine Tatsache, die heute auf dem Wege vermehrter Adrenalinbildung erklärt zu werden pflegt[126]). Die Durchschneidung der beiden nervi splanchnici verhinderte die Auswirkung des Zuckerstichs. Das gleiche erreicht die Exstirpation beider Nebennieren.

A. Insulin.

1. Chemische und physiologische Charakteristik.

Die Grundlage für alle Erkenntnisse, die uns bis heute aus der Beziehung Pankreas und Diabetes mellitus erwachsen sind, geliefert zu haben, ist das große Verdienst der Arbeiten von J. v. Mering und O. Minkowski[127]). Sie erwiesen bereits 1889 das Auftreten von Glucosurie bei pankreopriven Hunden. Auf der Suche nach dem wirksamen Agens der Bauchspeicheldrüse strandeten viele, Zülzer[128]) und Scott[129]) haben wohl der Auf-

---

[125]) Cl. Bernard, Leçons (cours du semestre d'hiver, 1854/55) S. 289. Der Reiz läuft von der Medulla oblongata aus durch das Rückenmark, den Sympaticus und die nervi splanchnici.

[126]) Vgl. dagegen die Untersuchungen von P. Trendelenburg und A. Fleischhauer, Zs. f. d. ges. exper. Med. (1913) **I**, 369: Der Zuckerstich bewirke Entzuckerung der Leber durch direkte nervöse Erregung der Leberzellen, d. h. also nicht auf dem Wege über die Nebennierensekretion.

[127]) Zbl. f. klin. Med. 1889 Nr. 23; s. a. De Dominicis: Opp., D. Ferm. S. 1660.

[128]) G. Zuelzer, Berl. klin. Wochenschr. **44**, 474 (1907); Verhandlg. Deutscher Ges. f. innere Med., Kissingen (München 1924) S. 135.

findung des Insulins am nächsten gestanden. Erst in der Macleodschen Torontoer Schule wurde 33 Jahre nach dem Experiment von v. Mering und Minkowski von F. G. Banting und C. H. Best[130]) die Isolierung und die wichtigsten physiologischen Eigenschaften des Pankreashormons folgerichtig umschrieben. Der Name „Insulin" wurde dabei von de Meyer[131]) übernommen, der diesen Ausdruck für das Sekret der Langerhansschen Inseln[132]) prägte.

Die Chemie des Insulins war zunächst in völliges Dunkel gehüllt. Die zahlreichen Reaktionen, die auf Eiweiß, Tryptophan, Tyrosin und Cystin positiv ausfielen, werden alle zu wiederholen sein, da sie nicht mit reinen Präparaten ausgeführt wurden, sogar meist mit solchen, die noch 75—95% Verunreinigungen enthielten.

Den ersten größeren Fortschritt über die chemische Natur des Stoffes erzielte jüngst J. J. Abel[133]), der reines kristallisiertes Insulin vom Sm.-P. 233° darstellen konnte. Die chemische Konstitution liegt noch nicht offen vor uns zutage. Jedoch läßt die Angabe Abels, daß mit der Reinigung aller Präparate eine Anreicherung von Schwefel[134]) einhergeht, gewisse Vermutungen zu[135]). Abel selbst hält Strukturen von der Art der Thiopiperazine bzw. Thiopolypeptide für wahrscheinlich. Physiologisch deutet die Anwesenheit des Schwefels auf eine ähnliche funktionelle Wirkung hin, wie wir sie im Glutathion bereits kennen[136]).

---

[129]) E. L. Scott, Amer. Jl. of Physiol. **29**, 306 (1912).

[130]) Jl. of laborat. a. clinical Med. **7**, 251, **8**, 464 (1922).

[131]) Archivic di fisiologia **7**, 96 (1906), zit. nach A. Grevenstuk und E. Laqueur, l. c. 53 (II. Numer.).

[132]) Langerhans, Beiträge zur mikr. Anatomie der Bauchspeicheldrüse, Diss., Berlin 1869.

[133]) Proc. Nat. Acad. Sc., U. S. A., **12**, 132 (1926).

[134]) Insulin, dem man durch 2½stündiges Erhitzen in 90%igem Phenol auf 205° den leicht abspaltbaren Schwefel als H_2S entzieht, wird therapeutisch unwirksam.

[135]) J. J. Abel, E. M. K. Geiling, zit. nach C. 1925, II, 1994.

[136]) Siehe bei R. S. Allen und J. R. Murlin, Proc. soc. exp. biol.

Von Allen und Murlin, sowie von H. A. Piper ist dieser Gedanke bereits nahegelegt worden. Insulin unterscheidet sich aber chemisch dadurch von Glutathion, daß die Nitroprussidreaktion negativ ausfällt. Offenbar liegt der Schwefel hier in Form einer Disulfid- und nicht einer SH-Verbindung vor.

Gehen wir zur Wirkung des Insulins über. Was beobachten wir, wenn man Insulin in das Blut normaler oder diabetischer Organe injiziert? Zwei Effekte treten aus der Mannigfaltigkeit der Erscheinungen klar hervor. Die Gewebe und das Blut verarmen an Zucker, der Gesamt-KH-Umsatz dagegen bleibt, wie sorgfältige Untersuchungen über den Gasstoffwechsel lehrten, unverändert. Das Rätsel, warum und wohin der Blutzucker nach Insulingaben verschwindet, hat eine Flut von Theorien über seinen Wirkungsmechanismus hervorgebracht, aber gelöst hat sie keine. Grevenstuk und Laqueur[137]) schreiben mit Recht: „Wir kennen keinen bestimmten Angriffspunkt des Insulins, und aller Wahrscheinlichkeit nach ist auch seine Bedeutung eine allgemeinere, und vielleicht nicht einmal damit erledigt, daß wir sagen: es greift in den Kohlehydratstoffwechsel ein." Das Kernproblem dreht sich um die Frage: wird der oxydative Zuckerumsatz richtungweisend beeinflußt, sei es nun, daß die anoxybiontische, sei es, daß die oxybiontische Phase an irgendeiner Stelle einen besonderen Impuls erhält, oder wird überhaupt kein Zucker mehr von den Leberzellen gebildet, d. h. wird der Zuckernachschub ausbleiben müssen, wenn alles Kohlehydrat verbraucht ist, und eine Blockade der Bildungsmöglichkeit aus Fett[138]) oder Aminosäuren durch die Insulindosis einsetzt[139]).

22, 492 (1925). So führt Reduktion mit H_2 zu einer Inaktivierung, Behandlung mit O_2 wieder zu einer Aktivierung des Insulins.

[137]) l. c. **53**, (II. Numer.) S. 255.

[138]) W. Laufberger, Klin. W. 1924, I, 264; 1925, I, 151.

[139]) C. Oppenheimer rechnet mit einer Doppelrolle des Insulins: 1. Co-Fermentwirkung (beim Hexosenangriff) und 2. Hormonwirkung (Zellwirkung als Antagonist des Adrenalins), Opp., D. Ferm., Lief. XI S. 1697.

Von der Vermutung ausgehend, daß das Sinken des Kohlehydratspiegels wahrscheinlich auch eine Veränderung an der Drei-Kohlenstoffstufe bewirken würde, wurde eine Klärung des Problems durch Bestimmung der Blutmilchsäure[140]) nach Insulingaben anzubahnen versucht.

Das Ergebnis dieser Versuche, die R. Kuhn und H. Baur in Gemeinschaft mit mir ausführten, war, daß mit Zuckerabfall regelmäßig Milchsäureanstieg und Acidose und mit Zuckertiefstand Milchsäureabfall und Alkalose einherging. Der Ablauf der Insulinwirkung war an den Milchsäurewerten und den pH-Messungen des Blutes eindringlicher zu verstehen, als es eine gewöhnliche Blutzuckerkurve zu zeigen vermochte[141]). Diese Arbeit war eine Bestätigung der qualitativen Befunde von Briggs und seinen Mitarbeitern[142]), die nach Insulininjektionen im Blute von Hunden Milchsäureanstieg bei gleichzeitigem Zucker- und Phosphatschwund beobachteten. In neuerer Zeit berichten jedoch Best[143]), Cori[144]) und Mendel[145]) von einem völlig unveränderten Milchsäureniveau im Blute nach Insulinzufuhr.

Um die Fragestellung weiter einzuengen, speziell um eine Entscheidung darüber herbeizuführen, ob Insulin eine Störung des Kohlehydratchemismus wirklich an der C_3-Stufe bedinge, suchten wir nun an der Reaktion Methylglyoxal + Glyoxalase → Milchsäure einen etwaigen Einfluß des Hormons nachzuprüfen.

2. Insulin und Antiglyoxalase.

Ansätze, ob zwischen innerer Sekretion des Pankreas und Glyoxalase Zusammenhänge bestehen, finden sich in der Literatur

---

[140]) Als Versuchstiere verwandten wir Ziegen, siehe ausführlicher Fußnote 141.

[141]) R. Kuhn, H. Baur und R. Heckscher, H. **141**, 68 (1924).

[142]) A. P. Briggs, J. Koechig, E. A. Doisy und C. J. Weber, Jl. Biol. Chem. **58**, 721 (1923/24).

[143]) C. H. Best und J. H. Ridout, Jl. Biol. Chem. **63**, 197 (1925).

[144]) C. F. Cori, Jl. Biol. Chem. **63**, 253 (1925).

[145]) B. Mendel, W. Engel und J. Goldscheider, Klin. W. **4.** Jahrg., 804 (1925).

bereits vor. So zeigten H. D. Dakin und H. W. Dudley[146]) im Jahre 1913, daß die Bauchspeicheldrüse einen spezifischen, thermolabilen, nicht dialysierbaren Stoff enthält, der schon in geringer Menge die Wirkung der Glyoxalase verhindert. Sie nannten ihn Anti-glyoxalase. Dakin und Dudley vermuten, daß die Antiglyoxalase, obwohl sie — wenn auch in verhältnismäßig geringer Menge — auch im Bauchspeichel nachgewiesen werden konnte, vor allem ein Produkt der inneren Sekretion sei und besondere Bedeutung für den Kohlehydratstoffwechsel besitze[147]). Für ihre Auffassung machen sie verschiedene Gründe geltend, ohne einen experimentellen Beweis für die endokrine Natur zu erbringen. Seit der Entdeckung des Insulins mag die Frage, ob zwischen dem Pankreashormon und der Antiglyoxalase Beziehungen walten, vielfach aufgeworfen worden sein. Wir finden aber keine Arbeiten, die sich mit dem eigenartigen Hemmungskörper der Glyoxalase beschäftigen. „Wie dieser wirkt, ist noch nicht näher untersucht, ebensowenig, ob er irgend etwas mit der Insulinfrage zu tun hat.“[147a])

Schon einige Jahre vor den Arbeiten von H. D. Dakin und H. W. Dudley hatte F. G. Hopkins[148]) beobachtet, daß die Milchsäurebildung im Muskel durch Pankreas-Auszüge gehemmt wird. Er veröffentlichte seine Ergebnisse aber erst 1915 in Gemeinschaft mit G. Winfield[149]). D. L. Foster und C. E. Woodrow[150]), die diese Beobachtung im Laboratorium von F. G. Hopkins weiter verfolgten, kamen zu der Ansicht, daß es einen besonderen Hemmungskörper für die spontane Milch-

---

[146]) Jl. Biol. Chem. **15**, 463 (1913).

[147]) Jl. Biol. Chem. **16**, 505 (1913), und zwar 506.

[147a]) Opp., D. Ferm., Lieferung **X** S. 1553.

[148]) Zit. nach H. D. Dakin und H. W. Dudley, l. c. 147.

[149]) G. Winfield und F. G. Hopkins, Jl. of Physiol. **50**, Proc. V (1915).

[150]) Biochem. Jl. **18**, 562 (1924); D. L. Foster, Biochem. Jl. **19**, 757 (1925).

säurebildung im Muskel gibt, der nicht mit der Antiglyoxalase identisch ist.

Eine analoge Erscheinung finden wir bei der Avitaminose. Es liegt hier eine Stoffwechselstörung vor, deren Ursache auf Unregelmäßigkeiten im Kohlehydrat-Chemismus zurückgeführt wird. Die bei der Avitaminose häufig auftretende vermehrte Milchsäureausscheidung durch den Harn kann schon durch geringe Insulingaben auf kurze Zeit zurückgedrängt werden[151]). Der Hemmungskörper blieb auch hier unaufgeklärt.

3. Methodik und Ergebnis.

Wir haben die Dismutation von Keto-aldehyden durch Glyoxalaselösungen aus Leber mit und ohne Zusatz von Insulin nach drei verschiedenen Methoden verfolgt:

1. mit Methylglyoxal als Substrat durch jodometrische Titration des noch vorhandenen Keto-aldehyds,
2. durch polarimetrische Bestimmung der aus Phenylglyoxal gebildeten optisch-aktiven Mandelsäure,
3. durch Analyse der gesamten Mandelsäure (aktive + racem.) nach R. Kuhn und E. Werle[152]).

Alle Methoden ergeben in genauer Übereinstimmung, daß genügend gereinigte Insulinpräparate ohne den geringsten Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit sind, selbst wenn 40 oder 100 neue klin. Insulin-Einheiten auf das Enzym aus 2 g Leber einwirken. Viele Insulinpräparate des Handels enthalten jedoch neben dem Insulin noch eine Beimengung, die sowohl Milchsäure- wie Mandelsäurebildung hemmt. Die Wirksamkeit von 2 ccm Leberpreßsaft kann z. B. durch 5 Einh. käuflichen Insulins auf weniger als die Hälfte erniedrigt werden. Daß es sich um die Antiglyoxalase von H. D. Dakin und H. W. Dudley handelt, ist sehr wahrscheinlich. Durch $^1/_4$stündiges Erhitzen der wäßrigen Lösung

---

[151]) L. Rosenwald, Bioch. Zs. **168**, 324 (1926).

[152]) R. Kuhn und E. Werle in einer demnächst erscheinenden Abhandlung.

auf dem Wasserbade geht die hemmende Wirkung der Insulin-Präparate vollkommen verloren.

Frei von Antiglyoxalase-Wirkung erwies sich bei Untersuchung verschiedener Proben Insulin von E. Lilly & Co., Indianopolis. Keinen oder nur geringen Effekt zeigten Präparate „A. B." von Allen & Hanburys Ltd. und The British Drug Houses, London, sowie Insulin Organon Oss, Holland. Starke Hemmung bewirkten Germano-Insulin[153]), Insulin Schering und Insulin Bayer.

B. Co-Zymase.

Eine neue Beziehung zwischen Pankreas und Milchsäurebildung nimmt A. J. Virtanen[154]) an. Er findet im Gegensatz zu den vorangehend beschriebenen Hemmungseffekten, daß Co-Zymase freie Präparate von Milchsäurebakterien durch Insulin aktiviert werden. Bei der alkoholischen Hefegärung läßt sich jedoch die Co-Zymase durch Insulin nicht ersetzen[155]). Ferner übt Hefen-Co-Zymase keine typische Insulinwirkung auf Kaninchen oder Mäuse aus[156]).

Abweichend von O. Meyerhof[157]) haben wir keine Aktivierung der Glyoxalase durch Muskelkochsaft gefunden, weder bei Anwendung von Methyl- noch von Phenylglyoxal als Substrat. Wir benützen als Co-Zymase[158]) Kochsäfte aus getrockneter und frischer Löwenbräuhefe, aus frischer Oberhefe der Sinner A.-G., aus Kalbs-, Schweine- und Taubenmuskel. In der Regel trat eine

---

[153]) Von W. Sailer-Vellahn, Mecklenburg.

[154]) Chem. Ber. **58**, 696 u. 2441 (1925); A. J. Virtanen u. H. Karström, Chem. Ber. **59**, 45 (1925/26).

[155]) O. Fürth, Bioch. Zs. **150**, 265 (1924); H. v. Euler und K. Myrbäck, H. **150**, 1 (1925).

[156]) Vgl. dazu E. Jorpes, H. v. Euler und R. Nilsson, H. **155**, 137 (1926).

[157]) Bioch. Zs. **159**, 432 (1925).

[158]) Nach O. Meyerhof beruht die von ihm beobachtete Aktivierung der Methylglyoxalase durch Kochsaft von Gehirnsubstanz und Muskulatur nicht auf der Anwesenheit eines ultrafiltrierbaren Co-Ferments.

geringfügige Verlangsamung der Reaktion ein. Nur in einem Falle, bei Zusatz von Leberkochsaft zu einer gealterten Glyoxalaselösung, die aus derselben Leber gewonnen war, beobachteten wir eine ganz schwache Erhöhung des Umsatzes.

Wir kommen zu dem Schlusse, daß Insulin und Co-Zymase weder als Aktivatoren noch als Hemmungskörper in die Reaktionen Methylglyoxal → Milchsäure bzw. Phenylglyoxal → Mandelsäure eingreifen, soweit sich diese Reaktionen losgelöst von der Zellstruktur enzymatisch verwirklichen lassen.

Die Verschiedenheit von Insulin und Antiglyoxalase, die aus unseren Versuchen klar hervorgeht, zeigt, daß die Bauchspeicheldrüse neben dem Insulin noch eine andere wirksame Substanz erzeugt, die eine Teilreaktion des Zuckerstoffwechsels zu beherrschen scheint.

Es ist noch nicht bekannt, ob und auf welchem Wege die Antiglyoxalase ins Blut und in die Gewebe gelangt. Wir vermögen ihre physiologische Bedeutung noch nicht zu umgrenzen. Die enzymatische Bildung von Milchsäure aus Methylglyoxal stellt nach den Untersuchungen von O. Warburg, O. Meyerhof und unserer vorliegenden Mitteilung[159]) unter normalen Umständen nicht die geschwindigkeitsbestimmende Teilreaktion der Glykolyse dar. Eine Hemmung der Glykolyse kommt — das intermediäre Auftreten von Methylglyoxal immer vorausgesetzt — nur bei Gegenwart sehr bedeutender Mengen von Antiglyoxalase in Frage.

Den Ausgangspunkt für eine eingehendere Bearbeitung der Antiglyoxalase werden die folgenden Tatsachen bilden, die eine weitgehende Abgrenzung des Hemmungskörpers von anderen Bestandteilen des Pankreas heute schon gestatten:

Die Antiglyoxalase läßt sich frei von Insulin gewinnen. Sie ist, wie H. D. Dakin und H. W. Dudley als erste fanden, in stark trypsinhaltigen Pankreatin-Präparaten vorhanden, die, wie

---

[159]) Siehe Kap. II, D S. 31.

wir heute wissen, ohne Insulinwirkung sind. Vom Trypsin konnte sie auf Grund ihrer größeren Resistenz gegen Alkali unterschieden werden. Bei den uns zur Verfügung stehenden Pankreas-Präparaten gelang es allerdings nicht durch Alkalibehandlung, wie sie von H. D. Dakin und H. W. Dudley, sowie von D. L. Foster zur Trypsinzerstörung ausgeführt wurde, proteasefreie Antiglyoxalase-Präparate zu erhalten. Die antiglyoxalatische Wirkung ging zurück, während noch bedeutende Trypsinmengen nachweisbar waren. Dafür ist es gelungen, Trypsin vollkommen frei von Antiglyoxalase herzustellen und so die Verschiedenheit beider Stoffe sicherzustellen.

Das Insulin kann, wie bekannt, nur durch Beseitigung bzw. Zerstörung des Trypsins in haltbarem Zustande gewonnen werden. Ich erbringe den Nachweis, daß es vollkommen frei von Antiglyoxalasewirkung darstellbar ist. Trypsinlösungen sind, da sie Insulin verdauen, frei von diesem.

Die Abtrennung der Antiglyoxalase von Trypsin gelingt mit Hilfe der von R. Willstätter ausgearbeiteten Adsorptionsmethoden. Besonders geeignet für den vorliegenden Zweck ist die Anwendung von Tonerde $C\gamma$ nach R. Willstätter und H. Kraut[160]). Aus den Glycerin-Extrakten der Bauchspeicheldrüse wird unter den Bedingungen, die E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck[161]) für die Trennung von Trypsin und Erepsin gewählt haben, die Antiglyoxalase vom Adsorbens aufgenommen. Die trypsinreiche Mutterlauge ist mit und ohne Zusatz von Enterokinase ohne Einfluß auf das glyoxalatische Enzym.

C. Gestaltung und Ausblick.

Kehren wir noch einmal zur Theorie der Insulinwirkung zurück. Beeinflußt das Pankreashormon wirklich eine chemisch reproduzierbare Phase im Hexosenumsatz? Eine Umwandlung

---

[160]) Chem. Ber. **56**, 1117 (1923).
[161]) H. **147**, 286 (1925).

von Glucose in Glykogen scheint speziell nach den schönen Versuchen von J. Hepburn und J. K. Latchford[162]) ausgeschlossen. Oder sollte nach E. J. Lesser[163]) einfach eine Aktivierung einer ganz normalen Meyerhof-Reaktion vorliegen? Möglich, aber der Angriffspunkt des Insulins bleibt uns mit einer solch breiten Erklärung weiterhin verhüllt. Es ist außerdem nicht ersichtlich, warum unter dieser Betrachtungsweise ein Niveauwechsel an der Milchsäurestufe nicht eintreten sollte. Die Versuche von B. Mendel[164]) und die vorliegenden sprechen entschieden gegen einen unmittelbaren Zusammenhang von Insulineffekt und Milchsäureproduktion.

Die Experimente, die das Insulin als Aktivator der Esterifizierungsvorgänge zwischen Hexose und Phosphat ansehen wollen, nämlich entweder nach A. J. Virtanen[165]) als beschleunigendes Agens bei der Zymosphosphatbildung oder nach Th. Brugsch[166]) als Co-Ferment der Phosphatese, sind noch nicht abgeschlossen und können kaum das Recht auf eine vollgültige Erklärung der mannigfaltigen Erscheinungen beanspruchen.

Auf welche Experimente wird sich eine künftige Theorie des Insulinmechanismus nun vertrauensvoll stützen können? Soll sie denjenigen von L. B. Winter und W. Smith[167]) und von Chr. Lundsgaard und Sv. A. Holbøll[168]) folgen, die von einer Umwandlung der α-β-Glucose in eine besondere Bereitschaftsform, der am-Glucose, oder in ein nicht reduzierendes rechtsdrehendes Kohlehydrat etwa von der Natur eines Dex-

---

[162]) Amer. Jl. of Physiol. **62**, 177 (1922).

[163]) E. Bissinger und E. J. Lesser, Bioch. Zs. **169**, 398 (1926).

[164]) B. Mendel glaubt daher, daß der Diabetes mellitus darauf beruhe, daß der überschüssige Zucker von den Gewebszellen nicht mehr verwertet werden kann.

[165]) Bioch. Zs. **171**, 76 (1926).

[166]) Th. Brugsch und H. Horsters, Med. Klin. 1926 H. 3.

[167]) Jl. of Physiol. **57**, 100, **58**, 327 (1924); Proc. roy. soc. **97**, 20 (1924).

[168]) Jl. Biol. Chem. **62**, 453 (1924), **65**, 305—369 (1925); Skand. Arch. Physiol. **46**, 327 (1925).

trins [169]) sprechen? Diese Deutung hat zweifellos den Nachteil, daß die Existenz solcher labiler Zuckerformen in freiem Zustande [170]) mit rein chemischen Daten nicht belegt ist. Ebenso hypothetisch mag die Vorstellung von R. Lépine, H. Bierry und L. Condorelli [171]) klingen, die von einer Bildung eines «sucre virtuel» oder eines «sucre protéidique» wissen wollen. Grevenstuk und Laqueur endlich sehen die Ursache des Diabetes in einer verringerten Bildung von Glucose an Oxysäuren und deren Derivate, die normale Größe solcher Bindungen sei Ergebnis der Insulinwirkung [172]).

In die Fülle und das Wirrwarr der zahlreichen Theorien über den Insulinmechanismus ist heute noch keine endgültige Ordnung zu bringen. Hinsichtlich der in Betracht gezogenen Störung des Kohlehydratstoffwechesls ist es gelungen, einen Eingriff des Insulins in die Phase Methylglyoxal → Milchsäure von der Hand zu weisen. Dagegen scheint die Rolle der Milchsäureregulierung — wenigstens mitbestimmend — der Antiglyoxalase zuzufallen. Die Berücksichtigung des hier diskutierten Materials verleiht der Vorstellung, daß Insulin als Hilfsstoff im Verein mit den Fermenten „des ersten Angriffs" den Hexosenabbau einleite, mehr und mehr Sicherheit.

Am Insulinproblem wiederholt sich der alte Ausspruch von J. Priestley [173]): Jedes gelöste Problem läßt viele andere auftauchen. Hieran anknüpfend schließt Cl. Bernard [174]) in seinen leçons sur le diabète: «Ainsi de problème en problème on

---

[169]) Nature **111**, 810, **112**, 829 (1923); G. S. Eadie, J. J. R. Macleod und E. C. Noble, Amerc. Jl. of Physiol. **72**, 614 (1925).

[170]) Nur in Form von Derivaten sind uns solche Zucker sicher bekannt.

[171]) C. r. soc. biol. **172**, 244 (1921), **90**, 615 (1924); Bull. Reale Acc. Med. Roma **50**, 97 (1924); Policlinico **125** (1. März) 1924, zit. nach Grevenstuk und Laqueur, l. c. **53** (II. Numer.).

[172]) A. Grevenstuk und E. Laqueur, l. c. **53** S. 267.

[173]) Zit. nach Cl. Bernard, Leçons sur le diabète, Paris 1877, S. 289.

[174]) Cl. Bernard, Leçons (glycogenèse hépatique) S. 289.

descend toujours plus avant, jusqu'à ce qu'on soit parvenu au phénomène primitif, où il faut s'arrêter.»

Fragen wir uns nahezu 40 Jahre nach dem Experiment von J. v. Mering und O. Minkowski: Stehen wir bereits vor diesem primitiven Phänomen, das uns ein Licht auf das Rätsel der Insulinwirkung zu werfen vermöchte?

Unsere Antwort lautet: nein.

V. Kapitel.

Milchsäurebildung aus Methylglyoxal.

A. Zur Darstellung des Methylglyoxals.

Diese erfolgte nach dem von H. O. L. Fischer und C. Taube[1]) angegebenen Verfahren durch Destillation von Dioxy-aceton[2]) mit Phosphorpentoxyd im Vakuum[2a]). Die von den genannten Autoren erhaltene Ausbeute von 4 g Methylglyoxal aus 5 g Dioxy-aceton, die 100% der Theorie entspräche, wurde nicht erzielt[3]). Die besten Ausbeuten, die ich bei Anwendung von 5 g Dioxy-aceton erhielt, betrugen etwa 60% der Theorie. Im Durchschnitt von 20 Darstellungen wurden 40% der Theorie erhalten.

Das Dioxyaceton muß vor Gebrauch scharf getrocknet werden.

Die Ausführung der Destillation vollzog ich in einem kleinen Rundkolben (etwa 150 ccm Fassungsvermögen), der durch möglichst kurz gewählte Glasröhren mit einem Reagenzsaugglas in Verbindung stand. Die Vorlage tauchte in ein Dewargefäß mit flüssiger Luft. Die ganze Apparatur stand unter einem Wasserstrahlpumpenvakuum. Das Auffangegefäß für das Methylglyoxal war nach der Seite der Pumpe durch ein dazwischen geschaltetes Rohr mit Phosphorpentoxyd gegen Feuchtigkeit geschützt.

---

[1]) Chem. Ber. **57**, 1502 (1924), und zwar 1506.

[2]) Der Direktion der Farbwerke vorm. Meister, Lucius & Brüning, Höchst a. M. bin ich für die Überlassung größerer Mengen von Dioxyaceton zu ergebenem Danke verpflichtet.

[2a]) Als erster hat H. v. Pechmann Methylglyoxal in Händen gehabt.

[3]) Es ist nicht ersichtlich, ob Fischer und Taube zu ihren Versuchen das monomolekulare oder das dimolekulare Dioxyaceton angewandt haben. Ich benützte stets das dimolekulare Produkt.

Die Mischung von 5 g Dioxyaceton und 15 g Pentoxyd führt man so rasch als möglich aus. Nach kurzem Anwärmen des Rundkolbens läuft die Reaktion von selbst zu Ende. Gelbgrüne Gase entweichen — des öfteren explosionsartig —, die sich in der Vorlage zu einer klaren, schwach gelbgrün gefärbten Flüssigkeit verdichten. Der Kolbenrückstand färbt sich indes tiefbraun bis schwarz unter starker Erwärmung des Gefäßes. Von Wichtigkeit ist eine lange und gute Kühlung der Vorlage in der flüssigen Luft.

Das Mengenverhältnis Triose : Pentoxyd war innerhalb der untersuchten Grenzen 1:3 bis 1:6 ohne erheblichen Einfluß auf die prozentuale Ausbeute, ebenso Verdoppelung oder Halbierung des Ansatzes. Versuche, die an sich heftige Reaktionsgeschwindigkeit durch Zusatz eines indifferenten Stoffes wie Kieselgur zu mäßigen, änderten das Ergebnis auch nicht wesentlich.

Dioxy-aceton angew. (g)	P_2O_5 (g)	Zusatz	Ausbeute (g)
5	15	—	1,4 — 1,6
5	15	10 g Kieselgur	1,3
5	30	—	1,4
2,5	10	—	0,7
10	30	—	2,6
10	30	15 g Kieselgur	3,0

Innerhalb gewisser Grenzen scheint die Güte des Vakuums auf die Ausbeute von Einfluß zu sein. So erhielten wir bei Anwendung von je 5 g Dioxy-aceton[4]) und 15 g Phosphorpentoxyd

bei 25 mm . . 1,6 g Methylgl. bei 14 mm . . 2,0 g Methylgl.
„ 15 „ . . 1,9 g „ „ 13 „ . . 2,2 g „

Die Druckangaben beziehen sich auf das System unmittelbar vor Beginn der Destillation.

Die erhaltene Flüssigkeit zeigt noch nach der Erwärmung auf Zimmertemperatur eine Zeit lang Gasentwicklung, was offen-

[4]) Das für diese Versuche angewandte, gleichfalls von den Höchster Farbwerken hergestellte Produkt verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Geheimrat Prof. R. Willstätter.

bar von anderen Zersetzungsprodukten aus dem durch Pentoxyd angegriffenen Dioxyaceton herrührt. Der Geruch des Methylglyoxals ist charakteristisch süßlich, ähnlich dem des Acroleins, nur nicht so stechend. Polymerisation tritt meistens nach wenigen Stunden ein, ist aber erst nach mehreren Tagen beendet, was man an dem allmählichen Übergang vom flüssigen in den festen Zustand verfolgen kann. Nur in einem einzigen Falle blieb das Produkt (im Schwefelsäure-Exiskkator aufbewahrt) 4 Tage lang flüssig. Ob dies auf der von Fischer und Taube[5]) kürzlich beschriebenen Erscheinung — daß Spuren mitgerissener Phosphorsäure die Polymerisation begünstige — beruht, ist nicht mehr näher untersucht worden.

Zur Reinigung wurde das polymerisierte Rohprodukt nochmals im Vakuum destilliert. Ausbeute durchschnittlich 75—80%. Die Destillation über Chlorcalcium nach J. Meisenheimer[6]) schien nicht von Vorteil, da einerseits die Ausbeute an rektifiziertem Methylglyoxal geringer, andererseits der erzielte Reinheitsgrad[6a]) nicht günstiger war. Unsere Präparate waren im Gegensatz zu den Angaben von C. Harries und H. Türk[7]) schon im kalten Wasser vollkommen klar löslich. Man kann jedoch für die Enzymversuche auch solche verwenden, die sich erst bei etwa $^1/_4$stündigem Erwärmen auf 55—60°[8]) bis auf 1% Flöckchen, von denen man abfiltriert, lösen. Die meist 0,4%igen Stammlösungen wurden mit 2 Tropfen verdünnter Schwefelsäure auf 250 ccm versetzt und mit Toluol überschichtet. Solche Lösungen erwiesen sich selbst bei Zimmertemperatur als sehr haltbar[9]). Im Verlaufe von einem Monat nahm der Hypojoditverbrauch durchschnittlich um 3—4%, im Laufe von 2 bis

---

[5]) Chem. Ber. **59**, 857 (1926).

[6]) Chem. Ber. **45**, 2635 (1912).

[6a]) Vgl. die weiter unten beschriebene Bestimmungsmethode.

[7]) Chem. Ber. **38**, 1630 (1905), und zwar 1632.

[8]) Dabei findet Depolymerisation statt.

[9]) Vgl. dagegen die ungleich ungünstigeren Erfahrungen von O. Meyerhof, Bioch. Zs. **159**, 432 (1925).

3 Monaten um 9—10% ab. Unter der Annahme, daß bei der Zersetzung ausschließlich Milchsäure bzw. andere durch Hypojodit nicht angreifbare Substanzen entstehen, geben diese Zahlen unmittelbar die verschwundene Menge Ketoaldehyd an. Unter der Annahme, daß Brenztraubensäure entsteht, sind die Verluste etwa doppelt so groß. Für die folgenden Versuche wurden nur frisch bereitete oder ganz wenige Tage gestandene Lösungen von reinem rektifizierten, festem polymerisierten Methylglyoxal verwendet.

Zur näheren Identifizierung des erhaltenen Produktes wurden folgende Reaktionen angestellt: Reduktion von Fehlingscher Lösung trat in der Kälte langsam, in der Hitze sofort ein. Versetzt man die wäßrige Lösung des Ketoaldehyds mit Phenylhydrazin und 60%iger Essigsäure, so erfolgt in der Kälte Ausfällung von gelbem kristallinen Methylglyoxal-osazon. Sm. P. (gef.) 144°.

Die von G. Denigès[10]) vorgeschlagenen Farbreaktionen mit Codein und Morphin in schwefelsaurer Lösung fielen positiv aus. Im Gegensatz zu Brenztraubensäure zeigt Methylglyoxal keine Farbveränderung auf Zusatz von konz. Nitroprussidnatrium in ammoniakalischer Lösung[10a]). Diese Reaktion scheint geeignet, um wenige Anteile von Brenztraubensäure in Methylglyoxal nachzuweisen.

B. Ermittlung des Umwandlungsgrades.

1. Mikrobestimmung der gebildeten Milchsäure.

Hierbei ist zu berücksichtigen, daß bei der oxydativen Destillation mit $KMnO_4$ in verdünnter schwefelsaurer Lösung nach dem Verfahren von O. v. Fürth und D. Charnass[11]) nicht nur Milchsäure, sondern, allerdings in erheblich geringerer Menge, auch Methylglyoxal Aldehyd liefert. Bei Anwendung von reinem Lithiumlactat in Mengen von 0,3 bis 3 mg konnte durchschnitt-

---

[10]) C. r. **148**, 172 u. 282 (1909); Beilstein 4. Aufl. **I**, 847.

[10a]) Siehe dagegen C. Neuberg, Bioch. Zs. **71**, 150 (1915), und zwar 155.

[11]) Bioch. Zs. **26**, 199 (1910).

lich 95% der theoretischen Ausbeute an Acetaldehyd erzielt werden, übereinstimmend mit den von R. Kuhn, H. Baur und R. Heckscher[12]) beschriebenen Analysen. Für gereinigtes Methylglyoxal (Tabelle 1) wurden durchschnittlich 8% der berechneten Aldehydmenge gefunden[13]), für Dioxyaceton (Oxanthin-Höchst) ergaben sich die gleichen Zahlen.

Tabelle 1.

Oxydation von Methylglyoxal und von Dioxy-aceton mit Permanganat nach O. v. Fürth und D. Charnass[14]).

Nr.	Substanz	Bisulfitverbrauch in ccm 0,00866 n-Jodlösung		Mole Aldehyd zus 1 Mol Methylglyoxal bzw. Dioxy-aceton
		gef.	ber.	
1	2,27 mg Methylgl.	0,7	7,27	0,10
2	4,54 mg „	1,0	14,54	0,07
3	4,54 mg „	0,8	14,54	0,06
4	9,08 mg „	2,9	29,10	0,10
5	1,73 mg Dioxyacet.	0,37	4.44	0,08
6	3,46 mg „	0,83	8,88	0,09

Ich habe versucht, aus Gemischen von Methylglyoxal und Milchsäure nach dem von D. D. van Slyke[15]) zur Entzuckerung physiologischer Lösungen vorgeschlagenen Verfahren, nämlich durch Behandlung mit Kalk-Kupfersulfat, das Methylglyoxal niederzuschlagen, um sich so von den nach Tab. 1 nötigen Korrekturen bei der Milchsäurebestimmung unabhängig zu machen. Dies gelang jedoch nicht.

---

[12]) H. **141**, 68 (1924), und zwar 75. Vgl. auch die method. Bemerkungen von G. Embden, H. **143**, 297 (1925) und S. Janssen und H. Jost, H. **148**, 41 (1925); O. Meyerhof, Bioch. Zs. **168**, 128 (1926), und zwar 137.

[13]) Nicht rektifiziertes Methylglyoxal lieferte in zwei übereinstimmenden Analysen 18% d. Th.

[14]) d-Glucose — je 7,8 mg — ergab in zwei übereinstimmenden Destillationen 0,23 Mole Aldehyd auf 1 Mol Glucose. Siehe dagegen S. W. Clausen, Jl. Biol. Chem. **52**, 263 (1922).

[15]) Jl. Biol. Chem. **32**, 455 (1917).

9,08 mg Methylglyoxal, in 20 ccm Wasser gelöst, wurden mit 4 ccm 5%iger $Ca(OH)_2$-Suspension und 4 ccm 10%iger $CuSO_4$-Lösung 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. 20 ccm des Filtrats wurden mit $KMnO_4$ destilliert. Der Bisulfit-Titer der Vorlage nahm um 3,01 ccm 0,00866 n-Jods ab. Für die Gesamtmenge von 28 ccm berechnet sich ein Verbrauch von 4,2 ccm, während für dieselbe Methylglyoxallösung vor der Behandlung nach van Slyke nur 2,9 ccm derselben Maßlösung verbraucht wurden. Durch die Vorbehandlung ist also der Einfluß des Methylglyoxals auf die Milchsäurebestimmung nicht beseitigt, sondern im Gegenteil erhöht worden, offenbar dadurch, daß die schwach alkalische Reaktion den Übergang von etwas Methylglyoxal in Milchsäure bewirkte.

Das bei der Bestimmung des Umwandlungsgrades noch unveränderte Methylglyoxal ist daher rechnerisch berücksichtigt worden. Unter der Annahme, daß 1 Mol Milchsäure 0,95 Mole, 1 Mol Methylglyoxal 0,08 Mole Acetaldehyd liefert, ergibt sich für die prozentische Umwandlung p

$$p = 41{,}3 \cdot \frac{v}{E} - 9{,}1.$$

Hierin bedeutet v die Anzahl Kubikzentimeter n/100-Jodlösung, die auf gebundenes Bisulfit entfallen, E die angewandte Menge Methylglyoxal (wasserfrei) in Milligrammen.

Die Ableitung ergibt sich nach obiger Voraussetzung:

$^1/_{1000}$ Mol Methylgl. (72 mg) $\sim$ 16 ccm n/100 Jod
$^1/_{1000}$ Mol Milchsre. (90 mg) $\sim$ 190 ccm n/100 Jod
100 Mol Methylgl. $\longrightarrow$ 125 Mol Milchsre.

Der gesamte Jodverbrauch setzt sich zusammen:

1. aus der unverbrauchten Menge Methylglyoxal, die zu 8% Aldehyd liefert,
2. aus den in Milchsäure verwandelten Anteilen, die zu 95% Aldehyd-bisulfit geben.

$$(1) \qquad \underset{\text{(in ccm n/100 Jod)}}{\text{Methylglyoxal}} = E \cdot \frac{100-p}{100} \cdot \frac{16}{72}$$

$$(2) \qquad \underset{\text{(in ccm n/100 Jod)}}{\text{Milchsäure}} = E \cdot \frac{p}{100} \cdot \frac{125}{100} \cdot \frac{190}{90}$$

Die Summe von Gleichung (1) und (2) entspricht der titrierten Anzahl Kubikzentimeter n/100 Jod nach dem Versuch.

$$v = E\left(\frac{(100-p)\cdot 16}{100\cdot 72} + \frac{p\cdot 125\cdot 190}{100\cdot 100\cdot 90}\right)$$

$$\frac{100\cdot v}{E} = (100-p)\cdot 0{,}22 + p\cdot 2{,}64$$

$$= 22{,}2 + p\,(2{,}64-0{,}22)$$

$$\frac{100\cdot v}{E} - 22{,}2 = 2{,}42\cdot p$$

$$p = 41{,}3\cdot\frac{v}{E} - 9{,}1.$$

2. Bestimmung des noch vorhandenen Methylglyoxals.

a) Nach R. Willstätter und G. Schudel.

Bei der Einwirkung von Jod und Alkali unter Bedingungen, wie sie R. Willstätter und G. Schudel[16]) für die quantitative Bestimmung von Aldosen empfohlen haben, wird Methylglyoxal nicht einfach zu Brenztraubensäure oxydiert, sondern es findet tiefgreifender Abbau und Jodierung statt. Bald nach Zugabe des Alkalis zu der mit Jod versetzten Methylglyoxallösung, meist nach etwa 4—5 Minuten, beobachteten wir eine milchige Trübung, die sich rasch in einen pulvrigen gelben Bodenkörper verwandelte. Dieser wurde in größerer Menge dargestellt (aus 2 g Methylglyoxal und 1 Liter n/10 J_2-Lösung + 600 ccm n/4 Na(OH))

[16]) Chem. Ber. **51**, 780 (1918).

und aus Aceton umkristallisiert. Die schönen regelmäßigen hexagonalen Täfelchen erwiesen sich durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt (118°) als reines Jodoform.

Die Bildung von Jodoform ist durchaus plausibel. Schreibt doch schon A. Lieben[17]) im Jahre 1870: „So oft ein Körper die Gruppe $CH_3COC \cdots$ enthält, wird er mit Jod und Kali Jodoform geben. Ich zweifle nicht, daß z. B. auch CH_3COCO_2H die Reaktion geben wird, wobei sich $(COOH)_2$ zugleich bilden sollte."

Trotz der Jodierung läßt sich die Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure auf diese Weise verfolgen, da der Jodverbrauch des Methylglyoxals innerhalb gewisser Grenzen von der Verdünnung (Tabelle 2) und der Oxydationsdauer (Tabelle 3) unabhängig ist und Milchsäure durch Hypojodit nicht oxydiert wird[18]).

0,137 g Lithium-lactat (Kahlbaum) verbr. 0,27 ccm n/10 Jod = 0,94% d. Th.[19]).

0,159 g Lithium-lactat (Kahlbaum) verbr. 0,37 ccm n/10 Jod = 1,12% d. Th.

Tabelle 2.

Oxydation von Methylglyoxal nach R. Willstätter und G. Schudel bei wechselndem Volumen des Reaktionsgemisches. Oxydationsdauer 20 Minuten.

Nr.	Methylglyoxal angew. (mg)	Reaktions-Vol. (ccm)	Verbrauch n/10 Jod (ccm)	Methylglyoxal gef. (mg)	Proz. der Theorie
1	17,5	20	6,58	23,7	135
2	16,0	60	6,09	21,9	137
3	17,5	150	6,52	23,5	134
4	17,5	250	6,70	24,1	138
5	17,5	350	6,62	23,8	136

[17]) A. **7** Spl. 218, und zwar 231 (1870).

[18]) Mit Borax-Jod fand G. Romijn, Zs. f. anal. Chem. **36**, 349 (1897), und zwar 357, bei 18stündiger Einwirkung sehr erhebliche Oxydation von Milchsäure.

[19]) Als theoretischer Wert ist der Verbrauch von 2 Atomen Jod für 1 Molekül Milchsäure angenommen.

Tabelle 3.

Unabhängigkeit von der Oxydationsdauer. Reaktionsvolumen 100 ccm.

Nr.	Methylglyoxal angew. (mg)	Zeit (Min.)	Verbrauch n/10 Jod (ccm)	Methylglyoxal gef. (mg)	Proz. der Theorie
1	18,2	15	6,95	25,0	137
2	18,2	40	6,94	25,0	137
3	17,2	15	6,52	23,5	137
4	17,2	60	6,41	23,1	134
5	18,5	15	7,00	25,2	136
6	18,5	120	7,05	25,4	137

In den letzten Spalten der Tabellen 2 und 3 ist die verbrauchte Jodmenge in Prozenten der für die Bildung von Brenztraubensäure berechneten angegeben. In den vorletzten Spalten stehen die scheinbar gefundenen Methylglyoxalmengen, die sich aus dem Verbrauch an ccm n/10 Jodlösung durch Multiplikation mit dem theoretischen Faktor 3,60 ergeben. Sie sind in den angeführten Beispielen durchwegs etwa 36% größer als die Einwagen.

Tabelle 4.

Abhängigkeit von der Methylglyoxalmenge. Reaktionsvolumen 80—120 ccm; Reaktionsdauer 20 Min.

Nr.	Methylglyoxal angew. (mg)	Verbrauch n/10Jod (ccm)	Methylglyoxal gef. (mg)	Proz. der Theorie
1	1,90	0,78	2,8	147
2	2,30	0,83 0,96	3,0 3,5	141
3	3,80	1,35	4,9	129
4	4,60	1,62	5,8	126
5	7,20	2,60	9,4	131
6	7,50	2,82	10,2	136
7	11,7	4,44	16,0	137
8	13,8	5,30	19,1	138
9	14,5	5,56	20,0	138
10	18,5	7,00	25,2	136
11	32,2	12,40	44,6	138
12	37,0	14,00	50,4	136

Von der Menge des angewandten Methylglyoxals ist das Ergebnis der Analyse nach Tab. 4 in weiten Grenzen (2—35 mg) unabhängig. Für die Versuche dieser Tabelle dienten 3 Methylglyoxalpräparate verschiedener Darstellung. Die Menge des Ketoaldehyds in mg erhält man durch Multiplizieren des Jodverbrauchs (ccm n/10 Lösung) mit 2,64.

Die aus Tabelle 4 abgeleitete, in Fig. 1 mitgeteilte Kurve, welche den Jodverbrauch in Abhängigkeit von der Methylglyoxalmenge darstellt, kann man zur Ermittlung des Umwandlungsgrades benützen.

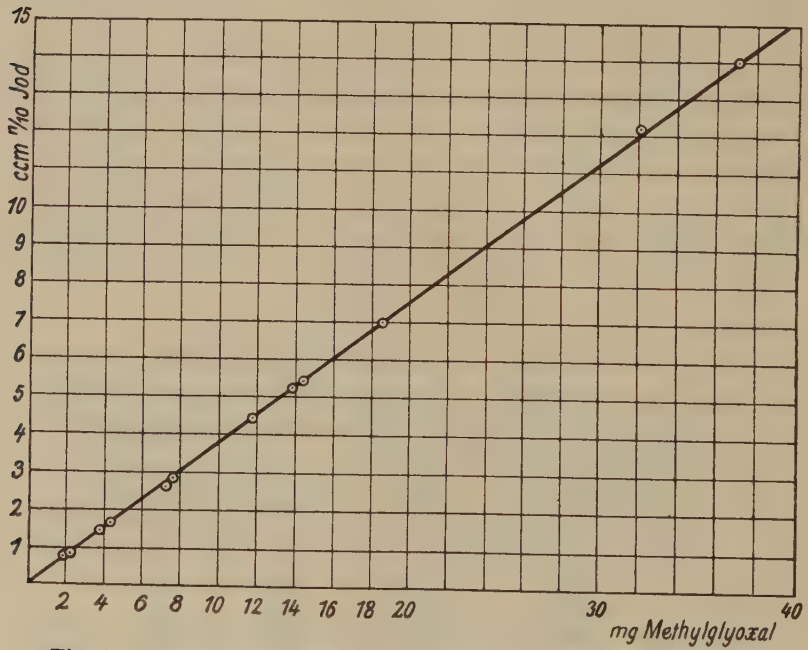


Fig. 1. Methylglyoxalmenge und Jodverbrauch bei Titration nach R. Willstätter und G. Schudel.

Um einen einsinnigen Verlauf der Reaktion zu erreichen, scheint es offenbar, daß zwei Bedingungen erfüllt sein müßten: Vermeidung der Jodierung sowie der Überoxydation. Dies versprach uns die Wahl einer für das Methylglyoxal speziell geeig-

neten Alkalikonzentration zu erreichen. Ansätze zu einer vorsichtigen und glatten Oxydation von Keto- und Oxyaldehyden, die sich damit quantitativ bestimmen ließen, finden sich in unserer großen Literatur merkwürdigerweise recht wenige. Einzig allein die Bedürfnisse in der Zuckerchemie haben viele Forscher veranlaßt, hier die Oxydationsverfahren zur quantitativen Bestimmung zu formen und zu verfeinern. Als erster versuchte sich G. Romijn[20]) an Formalinlösungen mit J_2-KJ und Boraxlösung. Seine Methodik war ungenau. Der Franzose J. Bougault[21]) arbeitete schon mit J_2- und Na_2CO_3-Lösung, später mit einer Lösung, die 15% Na_2CO_3 und 5% $NaHCO_3$ enthielt. 1918 wurde dann das Verfahren von R. Willstätter und G. Schudel[22]) veröffentlicht, das für die Bestimmung von Glucose neben Saccharose und Fruktose von grundlegender Bedeutung geworden ist. H. Colin und O. Liévin[23]) suchten durch Oxydation mit einer Mischung von J_2-KJ und Na_2HPO_4 und NaOH einen Fortschritt zu erzielen. 1923 endlich gelang es Fr. Auerbach und E. Bodländer[24]), eine wesentliche Verfeinerung aller bisherigen Oxydationsverfahren zu erbringen. In einer kritischen Übersicht zeigen sie, daß ein pH von 10,1—10,2 des Reaktionsgemisches sich am besten zur Oxydation von Glucose mit Jod und Alkali eignen muß.

b) Nach Fr. Auerbach und E. Bodländer.

Ersetzt man das freie Alkali durch die von Fr. Auerbach und E. Bodländer[25]) empfohlene äquimolekulare Mischung von 0,2 m Natriumcarbonat und 0,2 m Natriumbicarbonat, so findet keine Jodoformbildung mehr statt. Die Oxydation des Methylglyoxals verläuft gelinder und einheitlicher, aber noch immer

[20]) l. c. 18).
[21]) Jl. de Pharm. et de Chim. [7] **16**, 97 (1917); C. r. **164**, 1008 (1917).
[22]) Chem. Ber. **51**, 780 (1918).
[23]) Bull. Soc. Chim. [4] **23**, 403 (1918).
[24]) Zs. angew. Chem. **36**, 602 (1923).
[25]) Siehe l. c. 24).

nicht stöchiometrisch. Für 1 Molekül werden etwa $^5/_4$ Atome O verbraucht.

Methylgl. (mg)	ccm n/10 Jod Vorlage	Alkali-gemisch (ccm)	t Min.	ccm n/10 Jod-verbrauch	Methylgl. gef. (mg)	% d. Th.
4,80	10	100	122	1,65	5,90	123
12,00	10	100	122	4,10	14,80	123

Wird das Oxydationsgemisch Jod zu Alkali in der Richtung variiert, daß man die Alkalescenz des Gemisches noch weiter schwächt, so gelangt man zu den Verfahren c_1 und c_2 [26]), die beide nach der vorgeschriebenen Zeit genau 100% des theoretisch zu erwartenden Jodverbrauches erzielen.

c) Abgeänderte Bestimmungsverfahren.

Verfahren c_1.

Die neutrale [27]) Lösung des Methylglyoxals wird mit der 2—4fachen Menge des zu erwartenden Jodverbrauchs an ccm n/10 Jodlösung versetzt. Man fügt das $1^1/_2$—2fache der angewandten Jodlösung eines Gemisches von 0,2 molarer Na_2CO_3- und 0,2 molarer $NaHCO_3$-Lösung zu, verdünnt auf 200 ccm und läßt 125—140 Minuten bei 18° im Raum für konstante Temperatur stehen. Dann wird mit überschüssiger verdünnter Schwefelsäure angesäuert, und das ausgeschiedene Jod in bekannter Weise titriert. Die vorhandene Menge Methylglyoxal in mg ergibt sich aus der Abnahme des Jodtiters in ccm n/10 Lösung durch Multiplizieren mit 3,6. Das Ergebnis stimmt, wie Tabelle 5 zeigt, sehr genau mit den angewandten Methylglyoxalmengen überein.

---

[26]) Vgl. die weiter unten beschriebenen Bestimmungsverfahren.

[27]) Es ist zu beachten, daß bei Gegenwart eines Phosphatpuffers dieser zunächst durch Zugabe der berechneten Menge n/10 Lauge genau in sekundäres Phosphat übergeführt wird. Daß Phosphat in Form des sekundären Salzes die Bestimmung nicht stört, ergibt sich aus Tab. 9.

Tabelle 5.

Jodometrische Titration von Methylglyoxal.

Nr.	Methyl-glyoxal Lsg. (ccm)	ccm n/10 Jod-Vorlage	Alkali-gemisch (ccm)	t Min.	ccm n/10 Jod-verbrauch	Methylgl. in mg angew.	gef.	Proz. der Theorie
1	5,00	10,0	20,0	120	6,80	24,5	24,5	100
2	5,00	10,0	20,0	125	5,40	19,4	19,4	100
3	5,00	10,0	20,0	125	6,83	24,5	24,6	100,3
4	5,00	10,0	20,0	135	6,81	24,5	24,5	100
5	10,00	20,0	35,0	120	10,80	38,9	38,9	100
6	10,00	20,0	35,0	120	10,78	38,9	38,8	99,8
7	10,00	20,0	35,0	125	10,82	38,9	38,95	100,1
8	10,00	20,0	35,0	140	10,81	38,9	38,9	100

Für den Einfluß der Oxydationsdauer gibt Tabelle 6 ein Beispiel. Nach 60 Minuten waren erst 87%, nach 200 Minuten dagegen schon 110% des erwarteten Reduktionswertes erreicht.

Tabelle 6.

Wechselnde Einwirkungsdauer des Soda-Bicarbonat-Jod-Gemisches.

Nr.	Methyl-glyoxal Lsg. (ccm)	ccm n/10 Jod-Vorlage	Alkali-Gemisch (ccm)	t (Min.)	ccm n/10 Jod-verbrauch	Methylgl. in mg angew.	gef.	Proz. der Theorie
1	5,00	10,0	20	60	3,32	13,8	12,0	87
2	5,00	10,0	20	90	3,56	13,8	12,8	93
3	5,00	10,0	20	120	3,76	13,8	13,5	98
4	5,00	10,0	20	135	3,82	13,8	13,8	100
5	5,00	10,0	20	150	3,83	13,8	13,8	100
6	5,00	10,0	20	200	4,21	13,8	15,2	110

Die Unabhängigkeit des Verfahrens von der vorhandenen Substanzmenge, die für ein Bereich von 2 bis 60 mg Methylglyoxal gilt, ist aus Tabelle 7 zu ersehen.

Tabelle 7.

Proportionalität von Methylglyoxalkonzentration und Jodverbrauch.

Reaktionsvolumen je 200 ccm; Reaktionsdauer 130 Min. 18°.

Nr.	Methylgl. angew. (mg)	ccm n/10 Jod-Vorlage	ccm n/10 Jodverbr.	Methylgl. gef. (mg)	Proz. der Theorie
1	2,00	5,0	0,54	1,95	97,0
2	5,00	5,0	1,39	5,01	100,2
3	10,0	10,0	2,80	10,08	100,8
4	19,4	10,0	5,40	19,40	100,0
5	24,5	15,0	6,81	24,50	100,0
6	24,5	15,0	6,83	24,60	100,4
7	30,0	25,0	8,29	29,8	99,5
8	60,0	50,0	16,54	59,6	99,3

Die Menge der für die Oxydation angewandten Jodlösung ist bei 3—8 fachem Überschuß ohne Einfluß auf das Resultat: 13,40 mg Methylglyoxal wurden:

a) mit 10 ccm n/10 Jod und 18 ccm Alkaligemisch,

b) mit 20 ccm Jod und 35 ccm Soda-Bicarbonat,

c) mit 30 ccm Jod und 45 ccm Carbonat-Mischung 130 Minuten behandelt.

a) verbrauchte 3,63; b) 3,75 und c) 3,75 ccm n/10 Jod, entsprechend 13,10, 13,50 und 13,50 mg Methylgyoxal statt der angewandten Menge von 13,40 mg.

Verfahren c_2.

Man arbeitet bei Anwendung von 10 ccm n/10 Jod mit 100 ccm eines Alkaligemisches, das aus 7 Teilen 0,2 m $NaHCO_3$-Lösung und 3 Teilen 0,2 m Na_2CO_3-Lösung zusammengesetzt ist.

Die Oxydationsdauer ist in diesem Falle auf 75—85 Min. (bei 18°) abzukürzen, um stöchiometrischen Reaktionsverlauf zu erzielen.

Tabelle 8.

Abgekürztes jodometrisches Verfahren.

Je 10 ccm n/10 Jod + 100 ccm Soda-Bicarbonatgemisch 3:7.

Nr.	Methylgl. angew. (mg)	Oxydationsdauer (Min.)	ccm n/10 Jod Verbrauch	Methylglyoxal gef. (mg)
1	13,8	50	3,62	13,0
2	13,8	75	3,80	13,7
3	13,8	80	3,82	13,8
4	13,8	85	3,78	13,6
5	13,8	100	4,10	14,8

Dieses zweite Verfahren habe ich für enzymatische Versuche nicht angewandt, sondern mich hierfür immer des ersten (c_1) bedient.

C. Zur Theorie der jodometrischen Bestimmungsmethoden.

Ein Einblick in den Verlauf der Oxydation von Methylglyoxal durch Hypojodit läßt sich durch Untersuchung des primär zu erwartenden Oxydationsproduktes, der Brenztraubensäure, gewinnen. Diese reagiert unter den Versuchsbedingungen von R. Willstätter und G. Schudel unter starker Jodoformbildung. Die Abnahme des Oxydationswertes ist von der angewandten Substanzmenge stark abhängig.

Je 24,3 mg Brenztraubensäure wurden mit 10 ccm n/10 Jod + 15 ccm n/10 NaOH [28]) + 100 ccm Wasser 15, 20 und 60 Min. stehen gelassen. Jodverbrauch: 4,54, 4,63 und 4,68 ccm n/10, entsprechend einem Verbrauch von 0,823, 0,840 und 0,848 Molen Jod für 1 Mol Brenztraubensäure.

Für den folgenden Versuch mit wechselnden Substratmengen diente ein durch mehrfache Umkristallisation (aus Alkohol unter

[28]) Hiervon wurden etwa 2,5 ccm zur Neutralisation der Säure verbraucht.

Zusatz von Äther) gereinigtes Präparat von brenztraubensaurem Natrium[29]).

	Oxydationsdauer 15—20 Minuten			
Brenztraubensäure (mg):	9,8	13,1	19,6	45,9
Jodverbrauch (ccm n/10):	3,13	3,83	4,60	7,44
Mol Jod/Mol Brenztraubensäure:	1,41	1,29	1,03	0,71

Nach meinem für die Methylglyoxalbestimmung vorgeschlagenen Verfahren findet auch bei Anwendung von Brenztraubensäure keine Jodoformbildung statt, der Jodverbrauch ist wesentlich geringer als beim Arbeiten mit freiem Alkali, und er steht zur vorhandenen Menge der Ketosäure in einem konstanten Verhältnis[30]).

Brenztraubensäure (mg):	24,2	24,2	54,2	108,4
Jodvorlage (ccm n/10):	10	10	10	20
Jodverbrauch (ccm n/10):	2,27	2,19	5,43	10,00
Mol Jod/Mol Brenztraubensäure:	0,41	0,40	0,44	0,41

Es werden durchschnittlich 0,41 Mole Jod für 1 Mol Brenztraubensäure verbraucht.

Aus der Tatsache, daß auch in soda-bicarbonat-alkalischer Lösung Brenztraubensäure mit Jod reagiert, folgt, daß der anscheinend stöchiometrische Verlauf meiner Bestimmungsmethoden nicht auf einem quantitativen Übergang von Methylglyoxal in Brenztraubensäure beruhen kann, sondern durch Kompensation

---

[29]) Nach einigen Vorversuchen bewährte sich zur Reinigung folgendes Verfahren am besten: Man neutralisiert in Kältemischung vorsichtig mit 2 n-Na-OH, und zwar soweit, daß die Lösung noch eben sauer auf Lackmus reagiert, also Brenztraubensäure neben dem gebildeten Salz vorhanden ist. Das Natrium-Salz wird mit trockenem Äther ausgefällt. Man vermeidet so am besten das Auftreten von unliebsamen öligen Suspensionen. Der Niederschlag wird mit wenig absolutem Alkohol aufgekocht, filtriert und wieder mit Äther ausgefällt. In der Kältemischung gelingt es dann leicht, ein fein weiß-flockiges Produkt zu isolieren. Vgl. Beilstein 4. Aufl. III, 608.

[30]) Beim Glykolaldehyd dagegen — das Präparat stellte bereitwilligst Herr Dr. H. Lampe dar — konnte kein Unterschied im Gang der Oxydation erkannt werden, ob man nun nach dem Prinzip von Willstätter-Schudel arbeitete oder nach Verfahren c_1.

verschiedener Einflüsse zustande kommt. Die Anwendbarkeit der Verfahren wird dadurch aber in keiner Weise beeinträchtigt.

Reaktionsvermögen mit Hypojodit findet sich nicht bei allen α-Ketosäuren wieder. Reines dioxyweinsaures Natrium z. B. verbraucht nach Willstätter und Schudel auch nicht spurenweise Jod.

Oxalessigsäure (Oxymaleinsäure)[31]) und Dioxymaleinsäure[32]) reagieren dagegen unter diesen Bedingungen lebhaft.

19,9 mg Oxymaleinsäure verbrauchten bald nach dem Auflösen 7,05 ccm, 1 Stunde danach 5,90 ccm, 3 Tage später nur noch 2,56 ccm n/10 Jod.

16,99 mg Dioxymaleinsäure verbrauchten 4,31 und 4,36 ccm n/10 Jod, nach dreitägigem Stehen der wäßrigen Lösung nur noch 2,50 ccm.

In beiden Fällen findet rasch Zersetzung der wäßrigen Lösung statt.

Dioxyaceton, die einfachste Ketose, wird bemerkenswerterweise im Gegensatz zu den Ketohexosen von Jod in alkalischer Lösung leicht angegriffen[32a]). Angewandt wurde ein mehrfach aus Essigester umkristallisiertes Präparat, das bei 67—71° schmolz.

Ein schärferer Schmelzpunkt ist nicht zu konstatieren, da mit dem Schmelzen ein Übergang der dimeren in die monomere Form verbunden ist[33]).

Oxydationsdauer je 20 Min.; Jod: Alkali nach Willstätter und Schudel

Dioxy-aceton (mg):	9,6	12,3	18,0	24,5	49,0	92,0[34])
ccm n/10 Jod (verbr.):	1,91	2,53	3,39	3,96	4,75	9,01
Mol Jod/Mol Dioxyaceton:	0,90	0,93	0,85	0,73	0,44	0,44

[31]) Dargestellt nach L. I. Simon, C. r. **137** S. 855 (1903).

[32]) Darstellung nach H. J. H. Fenton, Jl. Chem. Soc. **87**, 811 (1905). Das Präparat wurde mir von Dr. E. v. Lippmann zur Verfügung gestellt, wofür ich ihm meinen besten Dank sage. Vgl. auch Inaugural-Diss. E. Maschmann (unter R. Willstätter), München 1921.

[32a]) Vielleicht tritt durch das Alkali Umwandlung in Methylglyoxal ein. Vgl. G. Pinkus, Chem. Ber. **31**, 31 (1898).

[33]) G. Bertrand, C. r. **129**, 341 (1899).

[34]) 60 Minuten Reaktionsdauer.

Hier ist ebensowenig wie bei der Brenztraubensäure ein konstantes Verhältnis zwischen angewandter Substanzmenge und Jodverbrauch zu erkennen. Die Unabhängigkeit von der Oxydationsdauer tritt auch hier zutage. Die Oxydationsprodukte des Dioxyacetons sind nicht näher untersucht worden. Da weder Jodoform auftritt — Jodierungsprodukte der C_3-Reihe sind unter den Verhältnissen nicht beständig —, noch ein stöchiometrischer Gang von verbrauchten Molen Jod zu angewandtem Mol Triose vorliegt, so darf man auf einen komplizierteren Oxydationsmechanismus schließen. Es scheint mir am wahrscheinlichsten, daß Sprengung der Kette erfolgt und nicht etwa Bildung von Glycerin-Carbonsäuren oder dergl.

Wendet man auf Dioxyaceton das mildere Verfahren c_1 [35]) an, so ist der Jodverbrauch wesentlich geringer. Für 12,8 mg Dioxyaceton ergab sich dabei ein Verbrauch von 0,82 ccm n/10 Jod. Dies entspricht 0,29 Mol Jod auf 1 Mol Triose.

D. Hydroxyl-ionen-katalyse und Pufferwirkungen.

Nach dem in Kap. V, B 1 beschriebenen Verfahren wurde die Einwirkung von Alkali auf Methylglyoxal untersucht, einerseits um einen Vergleich mit der enzymatischen Reaktion zu ziehen, andererseits um den OH'-Einfluß bei den späteren Enzymversuchen berücksichtigen zu können. Dabei hat sich gezeigt, daß bei gleichem anfänglichen pH Natronlauge und Phosphatgemische sehr ungleich wirken, so daß der Einfluß der Puffer für sich untersucht werden mußte. Die Ursache dieser Erscheinung ist leicht ersichtlich. Sie liegt in der Verschiedenheit von potentiellem und aktuellem OH'-Gehalt. Die OH'-Ionen einer sehr verdünnten Lauge werden durch die Lactatbildung rasch verbraucht, während der Puffer vermöge seines großen OH'-Reservoirs die Alkalescenz aufrecht erhält.

W. Denis [36]), der die Einwirkung von heißem Wasser und von Alkalien auf Methylglyoxal untersuchte, fand „a slow and

[35]) Siehe S. 64.

[36]) Amer. Chem. Jl. **38**, 561 (1907), und zwar 584.

incomplete transformation into lactic acid". Er erhielt maximal 51,7% der berechneten Menge Zinklactat. Nach meinen Beobachtungen [37]) gelingt es jedoch, z. B. durch 20 stündige Einwirkung von 10 ccm 2 n-NaOH auf 10 mg Methylglyoxal bei Zimmertemperatur über 95% in Milchsäure zu verwandeln.

Der Einfluß von Phosphatpuffern auf das Methylglyoxal ist auf Grund zahlreicher Versuche zwischen pH = 4,5 und pH = 7. bis zu 26 stündiger Einwirkungsdauer vollständig zu vernachlässigen. Jenseits des Neutralpunktes macht sich mehr und mehr die OH'-Katalyse geltend. Bei pH = 8 und 30° verschwinden z. B. in 5 Stunden 2%, in 25 Stunden 11% des vorhandenen Ketoaldehyds (Tab. 9). Bei pH = 9 ist die Umwandlung schon sehr beträchtlich.

Tabelle 9.

Einfluß der Puffer auf das Methylglyoxal. Gesamtvolumen je 20 ccm; jodometr. Bestimmungen nach Verfahren c_1, 30°.

Nr.	Phosphat-Puffer (m/5 molare Lösung)	pH	Zeit (Std.)	ccm n/10 Jodverbr.	ccm n/10 Jod f. t=o	Umwandlung (%)
1	6,4 sek. + 3,6 prim.	7,0	6	1,82	1,82	0,0
2	6,4 „ + 3,6 „	7,0	25	1,81	1,82	0,6
3	9,75 „ + 0,25 „	8,0	$2^1/_2$	1,82	1,82	0,0
4	9,75 „ + 0,25 „	8,0	$5^1/_2$	1,78	1,82	2,2
5	9,75 „ + 0,25 „	8,0	25	1,62	1,82	11,0
6	10 „ —	etwa 8,3	$-^1/_4$	2,78	2,78	0,0
7	10 „ —	„ 8,3	26	7,70	8,34	7,7
8	10 „ + 0,3 ccm n/10 NaOH	„ 8,7	$-^1/_2$	2,73	2,73	0,0
9	„ „	„ 8,7	1	2,69	2,73	1,5
10	„ „	„ 8,7	2	2,60	2,73	4,8
11	„ „	„ 8,7	$3^1/_2$	2,55	2,73	6,6
12	„ „	„ 8,7	5	2,30	2,73	15,8

[37]) Sowohl durch Bestimmung des verschwundenen Methylglyoxals nach Kap. V S. 59 wie durch Bestimmung der gebildeten Milchsäure nach Kap. V S. 56.

Bei dem für die enzymatische Milchsäurebildung optimal gefundenen pH = 7,5 kann man die Pufferwirkung bei nicht allzu langen Versuchsdauern unberücksichtigt lassen.

Die Wirkung von Cyankali auf Methylglyoxallösungen wurde desgleichen verfolgt. Nach 18 stündiger Einwirkungsdauer verschwanden von 18,0 mg Methylglyoxal durch Zugabe von 10 mg CNK bei pH = 7,5 u. 18° 58%, in einem anderen Falle von 19,0 mg Methylglyoxal und 6 mg CNK 47% des Ketoaldehyds[38]).

E. Kinetik der Milchsäurebildung.

Für die folgenden Versuche dienten wäßrige Auszüge aus frischer Schweineleber, deren Bereitung in Kap. V, F näher beschrieben wird.

1. Kontrollversuche.

Bei Anwendung aller jodometrischen Verfahren zur Verfolgung der Enzymwirkung ist in jedem Falle durch Kontrollversuche der Jodverbrauch der Enzymlösung selbst zu berücksichtigen. Er ist vor allem abhängig von der Herkunft und Darstellung der Enzymlösung, vom pH und von der Versuchsdauer.

Zwischen Enzymmenge und Jodverbrauch besteht in allen untersuchten Fällen Proportionalität. So verbrauchten

2 ccm einer Enzymlösung	3,94 ccm n/10 Jod
5 ccm dagegen	9,78 ccm n/10 „ (ber. 9,84).

Für 4 ccm einer anderen Enzymlösung ergab sich ein Verbrauch von 2,69 ccm, für 2 ccm von 1,40 (ber. 1,35), für 8 ccm von 5,47 ccm n/10 Jod (ber. 5,38).

Beispiel für die Abhängigkeit von der Zeit. Je 5 ccm Enzym:

Zeit (Stdn.):	$^1/_2$	1	$1^1/_2$	3	$6^1/_2$	30	48
ccm n/10 Jod:	3,12	3,12	3,14	3,12	3,12	3,03	2,93

[38]) Vgl. damit die Beobachtungen von O. Meyerhof, Bioch. Zs. **159**, 432 (1925).

Beispiel für die Abhängigkeit vom pH: je 5 ccm Enzymlösung:

	pH:	5	6	7	$7^1/_2$	8	9
ccm n/10 Jod:		3,82	3,71	3,65	3,65	3,67	3,39

Versetzt man eine Enzymlösung mit Methylglyoxal und titriert sofort, so entspricht der Reduktionswert des Gemisches genau der Summe der Reduktionswerte von Enzym allein und Substrat allein. Die Bestimmung des Methylglyoxals wird also durch Zusatz der Enzymlösung an sich nicht gestört.

Jodverbrauch in ccm n/10-Lösung für			
Enzym	Substrat	(Enzym + Substrat) ber.	(Enzym + Substrat) gef.
3,63	2,78	6,41	6,44
2,50	2,78	5,28	5,34
3,98	3,83	7,81	7,83
3,98	3,83	7,81	7,79

Mit dem an reinen Methylglyoxallösungen erprobten Bestimmungsverfahren — jodometrische Titration des Methylglyoxalgehaltes — läßt sich nun unter Berücksichtigung der mitlaufenden Kontrollversuche Wirkung und Qualität von Glyoxalase-Lösung quantitativ messend verfolgen.

2. pH-Kurven.

Die folgenden Messungen bezwecken nicht eine eingehende physikalisch-chemische Analyse der Aciditätsfunktion, sondern nur eine Orientierung über das pH-Optimum. Dieses liegt zwischen pH = 7 und pH = 8, und ich nehme pH = 7,5 als günstigsten Punkt an.

Der Abfall der in Fig. 2 wiedergegebenen Kurven ist nach der sauren Seite steil, nach der alkalischen Seite flacher. Bei gewissen Enzymlösungen (Tab. 10, Kurve I der Fig. 2) liegt das Optimum weiter im alkalischen Gebiet, entsprechend der in

Fig 6 dargestellten pH-Kurve für die Umwandlung von Phenylglyoxal in Mandelsäure.

Tabelle 10.

Je 2 ccm wäßriger Auszug aus frischer Schweineleber (1:4) + 10 ccm m/5-Phosphatpuffer[39]) + 10,0 mg Methylglyoxal in 5 ccm; Gesamtvolumen 17 ccm; Kontrollversuche genau so mit 5 ccm Wasser statt 5 ccm Methylglyoxallösung. Reaktionsdauer[40]) 6½ Std. bei 30° (Kurve I der Fig. 2).

Nr.	pH	ccm n/10 Jodverbrauch		Diff. (ccm n/10) Jod	Methylgl. (mg)		Prozent Umsatz
		Hauptvers.	Kontroll-Vers.		angew.	gef.	
1	5,0	6,57	4,08	2,49	10,0	8,96	**11**
2	6,0	5,95	4,08	1,87	10,0	6,73	**33**
3	7,0	5,65	4,08	1,57	10,0	5,65	**44**
4	8,0	5,34	4,08	1,26	10,0	4,54	**55**
5	8,45	5,31	4,08	1,23	10,0	4,54*)	**55**

Tabelle 11.

Je 10,0 ccm wäßriger Auszug aus Schweineleber (1:4) + 10 ccm m/5-Phosphat + 10,2 mg Methylglyoxal in 5 ccm; Reaktionsdauer für Nr. 1—5 3½ Stdn., für Nr. 6—9 7 Stdn., 30° (Kurve II a und II b der Fig. 2).

Nr.	pH	ccm n/10 Jodverbrauch		Diff. (ccm n/10) Jod	Methylgl. (mg)		Prozent Umsatz
		Hauptvers.	Kontroll-Vers.		angew.	gef.	
1	4,5	13,40	10,80	2,60	10,2	9,35	**8**
2	6,0	12,80	11,33	1,47	10,2	5,30	**48**
3	7,0	11,20	10,25	0,95	10,2	3,40	**67**
4	8,0	10,80	9,95	0,85	10,2	3,05	**70**
5	8,45	10,80	9,93	0,87	10,2	3,35*)	**68**
6	4,5	12,90	10,48	2,42	10,2	8,70	**15**
7	7,0	10,85	10,12	0,73	10,2	2,60	**75**
8	8,0	10,58*)	9,95	0,63*)	10,2	2,25*)	**78**
9	8,5	10,80*)	9,97	0,83*)	10,2	3,00*)	**71**

Für das pH-Optimum ergibt sich eine Anzahl von 9,0 Gl.E. in 100 ccm dieser Enzymlösung.

---

[39]) pH = 8,45 ist sekundäres Phosphat + Natronlauge.

[40]) Als Reaktionsdauer gilt allgemein die Zeit vom Zusatz des Substrates bis zum Zusatz der Jodlösung.

*) Korrigiert für OH'-Katalyse des Methylglyoxals.

Tabelle 12.

Je 10 ccm Enzym aus Kalbsleber + 10 ccm m/5-Phosphat + 20,1 mg Methylglyoxal in 10 ccm; Reaktionsdauer 19 Stdn. bei 30° (Kurve III der Fig. 2). Zur Bestimmung nach Willstätter-Schudel wurden je 10 ccm entnommen. Umrechnungsfaktor ccm n/10 Jod : mg Methylglyoxal für das angewandte Substrat besonders ermittelt.

Nr.	pH	ccm n/10 Jodverbrauch		Diff. (ccm n/10) Jod	Methylgl. (mg)		Prozent Umsatz
		Hauptvers.	Kontroll-Vers.		angew.	gef.	
1	6,0	5,06	3,17	1,89	6,7	2,2	67
2	7,0	4,29	3,60	0,69	6,7	0,70	90
3	8,0	4,57*)	4,00	0,57*)	6,7	0,55*)	92
4	8,5	5,52*)	4,50	1,02*)	6,7	1,0 *)	85

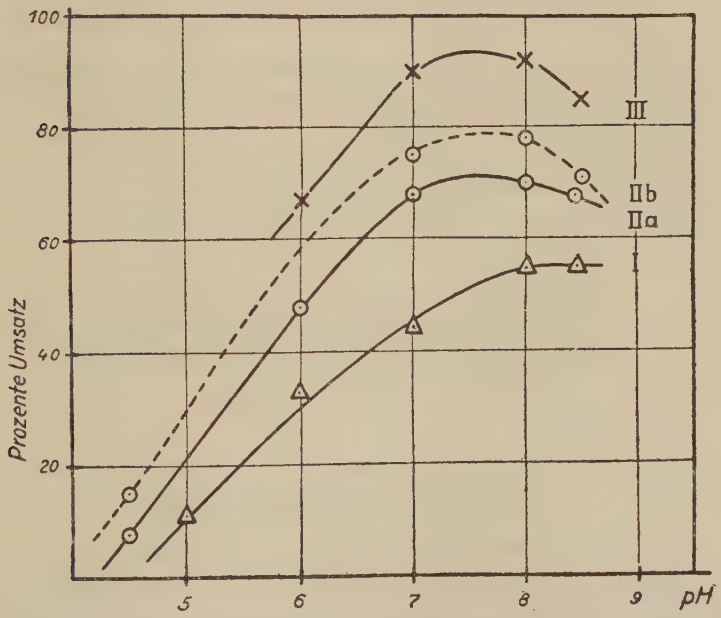


Fig. 2. Aktivitäts-p_H-Kurven der Methylglyoxalase aus Leber.

3. Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit

sind bei pH = 7, 8 einander im geprüften Bereiche 1 : 8 proportional. Man findet nach Tab. 13, daß gleiche prozentische Umwand-

lungen erzielt werden, wenn das Produkt aus Enzymmenge und Reaktionsdauer konstant ist.

Tabelle 13.

Glyoxalasemenge und Reaktionsgeschwindigkeit.

Dialysierte Enzymlösung aus Schweineleber; je 9,80 mg Methylglyoxal + 10 ccm m/5-Phosphat von pH = 7,8; Gesamtvolumen immer 22 ccm; 30°.

Nr.	ccm Enzym	Zeit (Stdn.)	ccm n/10 Jod	Methylglyoxal gef. mg	Prozent Umsatz
1	2,5	24	1,61	5,80	41
2	4,0	15	1,61	5,80	41
3	10,0	6	1,72	6,19	37
4	20,0	3	1,66	5,96	39

Auch bei pH = 6,0 wird die Bildung einer bestimmten Milchsäuremenge durch Verdoppelung der Enzymkonzentration schon in der halben Zeit erzielt.

Dieselbe Enzymlösung in Tab. 13, aber vor der Dialyse. Je 9,8 mg Methylglyoxal + 10 ccm m/5 Phosphat vom pH = 6,0. Gesamtvolumen 22 ccm; 30°.

ccm Enzym	Zeit (Stdn.)	Diff. ccm n/10 Jod	Methylgl. gef. mg	Prozent Umsatz
5	24	1,86	6,71	31,5
10	12	1,86	6,58	32,8

4. Einfluß der Substratkonzentration.

Die Milchsäuremengen, die durch eine bestimmte Enzymmenge in gleichen Zeiten gebildet werden, sind von der Menge des dargebotenen Methylglyoxals nahezu unabhängig, was für eine sehr bedeutende Affinität des Enzyms zu diesem Substrat spricht. Erst in sehr starker Verdünnung nimmt die Menge des Reaktionsproduktes bei weiterer Verminderung der Substratkonzentration ab.

Tabelle 14.

Affinität zum Methylglyoxal.

Je 10 ccm Enzym — 10 ccm m/5-Phosphat vom pH = 7,8; Gesamtvolumen 30 ccm; Reaktionsdauer 120 Minuten; 30°.

Nr.	Methylglyoxal mg	Normalität d. Substrats	ccm n/10 Jodverbrauch Hauptversuch	ccm n/10 Jodverbrauch Kontrollvers.	Diff. Jod	Methylglyoxal gef. (mg)	Prozent Umsatz	Milchsäure gebildet (mg)
1	9,80	0,0045	12,20	11,22	0,98	3,53	64,0	7,84
2	24,50	0,0114	15,94	11,16	4,78	17,2	29,8	9,12
3	49,0	0,0227	22,78	11,20	11,58	41,7	14,84	9,12

Die Gl. E. in 100 ccm Enzymlösung berechnen sich zu 15,0 bei einem Gl. W. von 5,5.

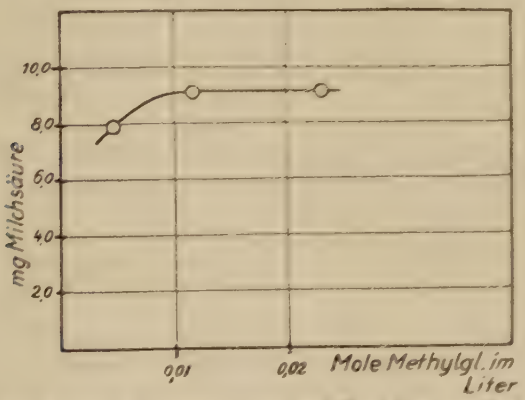


Fig. 3. Methylglyoxalkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit.

5. Zeitlicher Verlauf.

Die enzymatische Disproportionierung gehorcht in keinem der zahlreich untersuchten Fälle dem Zeitgesetz erster Ordnung. Die für eine monomolekulare Reaktion berechneten Konstanten fallen stark und stetig ab. Aus den in Tab. 20 mitgeteilten Stabilitätsversuchen geht hervor, daß hierfür — mindestens teilweise — Enzymzerstörung verantwortlich zu machen ist. Als Beispiel für

den Reaktionsverlauf, wie man ihn mit frisch bereiteten, gut wirksamen Enzymlösungen meist beobachtet, sei die Tab. 15 angeführt. Die daraus abgeleitete Kurve (Fig. 4) liegt der Berechnung der Glyoxalase-Einheiten und Glyoxalase-Werte zugrunde.

Tabelle 15. (Fig. 4.)

Reaktionsverlauf mit stark wirksamer Enzymlösung.

40 ccm Enzym (Auszug aus Schweineleber mit 5 Teilen Wasser + 20 ccm m/5-Phosphat von pH = 8,0 + 97,9 mg Methylglyoxal in 20 ccm Wasser; 30°. Zur Bestimmung je 10 ccm entnommen.

Nr.	Zeit (Min.)	ccm n/10 Jodverbrauch Hauptvers.	Kontrollvers.	Diff. ccm n/10 Jod	Methylgl. gef. (mg)	Prozent Umsatz
1	20	9,08	5,99	3,09	11,10	9,2
2	40	8,90	6,09	2,81	10,10	17,3
3	135	8,30	6.09	2,21	7,96	34,9
4	270	7,86	6,09	1,77	6,38	47,8
5	820	7,18	6,15	1,03	3,71	69,9
6	1500	6,90	6,25	0,65	2,34	80,9

Die gefundene Anzahl Gl.E. in 100 ccm Enzymlösung betrug 26,4, der Gl.W. 12,8. (Entnahme 4 wurde der Berechnung zugrunde gelegt.)

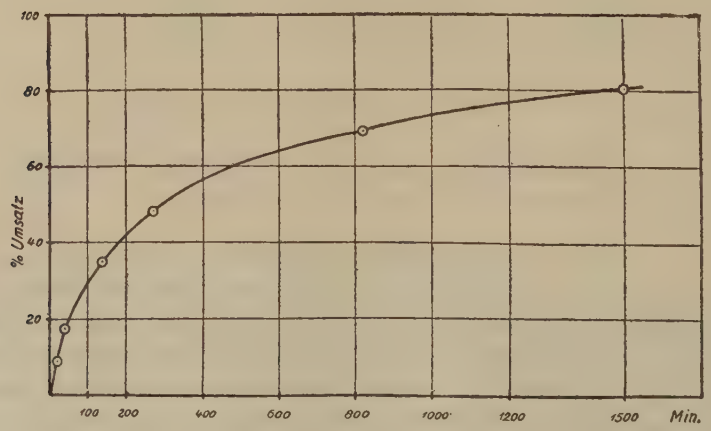


Fig. 4. Kinetik der Milchsäurebildung.

Tabelle 16. (Fig. 5.)

Reaktionskinetik mit gealtertem und schwach wirksamem Enzym. Für Nr. 1—3: 30 ccm gealtertes Enzym (3 Tage bei Zimmertemperatur) + 30 ccm m/5 Phosphat von pH = 7,35 + 146 mg Methylglyoxal in 30 ccm Wasser; zur Titration je 10 ccm entnommen. Für Nr. 4—6: 10 ccm frische Enzymlösung + 10 ccm m/5 Phosphat von pH = 7,5 + 49 mg Methylglyoxal in 15 ccm Wasser; zur Titration je 10 ccm entnommen. Beide Versuche bei 30°.

Nr.	Zeit (Stdn.)	ccm n/10 Jodverbrauch		Diff. ccm n/10 Jod	Methylgl. angew. (ber. in ccm n/10 Jod)	Prozent Umsatz
		Hauptvers.	Kontrollvers.			
1	$6^1/_2$	7,23	3,12	4,11	4,54	9,5
2	30	6,50	3,03	3,47	4,54	24
3	48	6,30	2,93	3,37	4,54	26
4	1	6,48	2,85	3,63	3,78	4
5	$17^1/_2$	5,72	2,85	2,87	3,78	24
6	42	5,12	2,85	2,27	3,78	40

Mit gealterten oder schwach wirksamen Lösungen ergibt sich in der Regel das in Fig. 5 (vgl. die Tab. 16) dargestellte Bild. Man erkennt, daß auch bei annähernder Übereinstimmung der Anfangsgeschwindigkeiten der spätere Verlauf der Kurven erheblich abweichen kann.

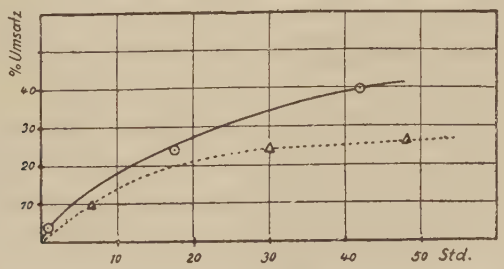


Fig. 5. Zeit-Umsatzkurven bei geringer enzymatischer Aktivität.

finden wir abhängig von der Zahl der angewandten Enzymeinheiten, aber auch von der Natur der Enzymlösung und vom pH. Mitunter bleibt die Reaktion schon stehen, wenn etwa 30% Umsatz erreicht sind (vgl. z. B. Fig. 5). Das wurde aber nur bei schwach wirksamen Lösungen beobachtet. Die Ursache ist[41]) vermutlich Zersetzung des Enzyms im Laufe der tagelangen Versuchsdauern. Mit enzymreichen Lösungen gelingt es (Tab. 17) schon in 1—2 Stunden 85—90% Umsatz zu erzielen und bei längerer Einwirkungsdauer das gesamte Methylglyoxal in Milchsäure zu verwandeln.

Tabelle 17.

Umwandlungsgrenze bei Anwendung guter Enzymlösungen.

Je 10 ccm frisch bereitetes Enzym + 10 ccm m/5-Phosphat + 5 ccm Methylglyoxal-Lösung; 30°; Nr. 10—13[42]) nach Willstätter u. Schudel titriert, wie in Tab. 12 berechnet.

Nr.	pH	Zeit (Stdn.)	ccm n/10 Jod für Methylgl.	Methylglyoxal (mg) angew.	gef.	Prozent Umsatz
1	8,0	2	0,31	9,8	1,1	89
2	8,0	16	0,31	9,8	1,1	89
3	6,8	18	0,39	15,0	1,4	91
4	6,8	42	0,17	15,0	0,6	96
5	6,8	18	0,59	15,0	2,1	86
6	6,8	42	0,00	15,0	0,0	100
7	7,0	1	0,39	10,0	1,4	86
8	7,0	47	0,01	10,0	0,0	100
9	9,0	47	0,39	10,0	1,4	86
10	6,0	72	3,70	20,1	5,4	73
11	7,0	72	0,00	20,1	0,0	100
12	8,0	72	0,01	20,1	0,0	100
13	8,5	72	0,18	20,1	0,1	99

[41]) Vgl. die Stabilitätsversuche in Tab. 20.

[42]) Entnahme nach 19 Stunden, vgl. Tab. 12.

F. Enzymlösungen.

1. Bereitung.

Bei Untersuchung der Leber frisch getöteter Tiere ergaben sich beträchtliche Abweichungen hinsichtlich der Wirksamkeit gleichartig dargestellter Auszüge. Ein charakteristischer Unterschied zwischen den einzelnen Tiergattungen läßt sich aber daraus nicht ableiten, da verschiedene Individuen auch ein und derselben Spezies untereinander stark differieren (Tab. 18).

230 g frische Leber, mechanisch von Fett und Bindegewebe befreit, werden durch eine Fleischmaschine getrieben und mit 1050 ccm Wasser und 1—1½ ccm Eisessig ¾ Stunden unter häufigem Umschütteln bei 30° extrahiert[43]). Man zentrifugiert und verwendet die klare, rötlich gefärbte, manchmal milchig getrübte Lösung unmittelbar zu den Versuchen. Unsere Auszüge waren in der Regel 3—5 Stunden nach dem Tode des Tieres gebrauchsfertig. Zur Aufbewahrung wird mit Toluol überschichtet. Besondere Versuche haben gezeigt, daß die enzymatische Umwandlung des Methylglyoxals durch Leberauszüge durch Überschichten des Reaktionsgemisches mit Toluol nicht gehemmt wird. H. D. Dakin und H. W. Dudley beobachteten bei Anwendung von Phenylglyoxal und Hundeserum nahezu vollständige Inaktivierung durch Toluol.

Mit Rücksicht auf die Löslichkeit des Phenylglyoxals in Toluol werden bei den Versuchen mit Phenylglyoxal (siehe Kap. VI) toluolgesättigte Lösungen benützt, ein Überschuß des Antiseptikums aber vermieden.

Die so bereiteten Lösungen enthalten 2—24 Gl. E.[44]) in 100 ccm, was beim durchschnittlichen Trockengehalt von 2,3% einem Gl. W. von 1—10 entspricht.

---

[43]) Leber-Trockenpräparate nach R. Willstätter u. F. Memmen erwiesen sich als unwirksam, H. **138**, 216 ff. (1924).

[44]) Preßsäfte aus Schweineleber zeigten des öfteren einen wesentlich höhern Gehalt an Gl.E. an, vgl. Kap. V, F, 4.

Tabelle 18.

Wirksamkeitsvergleich von Glyoxalaselösungen aus der Leber verschiedener Tiere.

Nr.	Tier	Extrationsart	dauer Std.	ccm E Lösg.	Gesamtvolumen ccm	pH	Einwirkungsdauer Std.	ccm n/10-Jod Hauptvers.	ccm n/10-Jod Kontrvers.	Jod Diff.	Methylglyoxal (mg) gef.	Methylglyoxal (mg) angew.	Proz. Umsatz	Gl.-E. in 100 ccm
1[1])	Kalb	sauer, mit 5 Tl. H_2O	1	10,0	25	8	4	12,60	7,40	5,20	8,4	10,0	16	1,0
2[1])	Kalb	physiolog. NaCl-Lösg., 1 : 6	1	10,0	25	7	24	8.00	4,50	3,50	5,0	12,5	60	1,4
3[1])	Ochs	sauer, mit 4 Tl. H_2O	$1^1/_2$	10 0	25	7	15	16,60	14,98	1,62	1,8	10,0	82	2,8
4	Hund	sauer, mit 5 Tl. H_2O	$1^1/_2$	10,0	25	8	15	11,68	8,90	2,78	9,8	10,0	2	etwa 0,01
5	Schwein	sauer, mit $3^1/_2$ Tl. H_2O	0,75	5,0	20	8	$1^1/_2$	7,45	5,20	2,25	8,1[2])	10,2	$20^1/_2$	8,8[2])
6	Schwein	sauer mit, 4 Tl. H_2O	0,75	10,0	25	7,5	$4^1/_4$	13,10	12,15	0,95	3,3	16,7	80	24,0
7	Lamm	sauer, mit 5 Tl. H_2O	0,70	10,0	25	7,5	$2^1/_2$	10,51	7,89	2,62	9,4	15,1	$37^1/_2$	8,0

[1]) Nach Willstätter und Schudel titriert; der Umrechnungsfaktor für das benutzte Präparat von Methylglyoxal wurde besonders ermittelt.

[2]) Korrigiert wegen OH'-Katalyse.

Tabelle 19.

Extraktion und Dialyse.

Für die Versuche 1—4, 5—6 und 7—8 dienten verschiedene Proben von frischer Schweineleber.

Nr.	Extraktionsart	Extraktionsdauer Std.	Dialyse Std.	ccm E-Lösg.	Gesamtvol. ccm	Proz. Trokkengew.	Einwirkungs-Dauer Std.	p_H	ccm n/10-Jod Hauptvers.	ccm n/10-Jod Kontr.-vers.	Joddifferenz	Methylglyoxal (mg) gef.	Methylglyoxal (mg) angew.	Proz. Umsatz	In 100 ccm Gl.-E.	In 100 ccm Gl.-W.
1 a)	sauer 0,1% mit 4 Tl. H_2O	0,75	—	10,0	25	3,52	3	7,5	17,75	10,96	6,79	24,4	24,5	0	0	0
b)		0,75	—	10,0	25	3,52	24	7,5	18,00	14,28	3,72	13,4	24,5	45	3,35	0,95
2	sauer 0,25% mit 4 Tl. H_2O	0,75	—	5,00	12	2,28	3	7,5	6,71	5,13	1,58	5,7	7,94	28	4,9	2,1
3	alkal. 0,1% Na_2CO_3	0,75	—	5,00	12	3,11	3	7,5	8,17	6,57	1,60	5,8	7,94	27	4,3	1,4
4	Nr. 1a) dialysiert	0,75	14	5,00	12	1,58	3	7,5	4,21	2,80	1,41	5,1	7,94	36	7,6	4,8
5 a)	sauer, mit $4^1/_2$ Tl. H_2O	0,80	—	10,0	30	2,40	$5^1/_2$	8,5	12,00	10,00	2,00	7,2	9,8	27	1,5	0,6
b)		—	—	10,0	30	2,40	24	8,5	11,67	10,00	1,67	6,0	9,8	39	0,48	0,2
6 a)	sauer, mit $4^1/_2$ Tl. H_2O	0,80	14	10,0	30	0,51	$5^1/_2$	8,5	4,16	2,68	1,48	5,3	9,8	46	2,40	4,8
b)		—	—	10,0	30	0,51	24	8,5	3,84	2,64	1,20	4,3	9,8	56	0,72	1,4
7 a)	sauer, mit 5 Tl. H_2O	0,75	—	10,0	22	2,07	2	8,0	13,50	13,19	0,31	1,1	9,8	89	>22	>10,6
b)		—	—	10,0	22	2,07	16	8,0	13,50	13,19	0,31		9,8	89		
8 a)	sauer, mit 5 Tl. H_2O	0,75	16	10,0	22	0,66	2	8,0	5,83	3,65	2,18	7,8	9,8	20	3,1	3,7
b)		—	—	10,0	22	0,66	16	8,0	4,73	3,26	1,47	5,3	9,8	46	—	—

2. Dialyse.

Durch 14stündige Dialyse in Fischblasen lassen sich bis zu 80% des Trockengewichtes entfernen, wodurch eine Verbesserung des Gl. W. auf das 5—8fache erzielt wird.

Für die bei der Dialyse wiederholt beobachtete Wirksamkeitszunahme, die bis zur Verdoppelung der angewandten Enzymeinheiten führen kann, seien in Tab. 19 einige Beispiele aufgestellt. Mitunter findet aber auch, namentlich bei sehr stark wirksamen Lösungen, erhebliche Abnahme der Wirksamkeit während der Dialyse statt (Tab. 19 Nr. 7 u. 8).

Während der Dialyse beobachteten wir vielfach Ausflockung von Eiweiß, in manchen Fällen erst bei längerem Stehen der dialysierten Lösungen. Der Niederschlag reißt den größten Teil des Enzyms mit sich. Für die Wertbestimmung der Dialysate wurden die Niederschläge in der überstehenden Lösung gleichmäßig suspendiert.

3. Haltbarkeit.

Die Haltbarkeit des Enzyms in gleichartig dargestellten Lösungen ist nicht immer dieselbe. So finden wir nach eintägigem Stehen bei Zimmertemperatur einmal nur noch 30% der ursprünglich vorhandenen Wirksamkeit (Nr. 7 der Tab. 20), in einem anderen Falle nach einer Woche aber noch 46% (Nr. 2 der Tab. 20). Eine Lösung, die ursprünglich 28 Gl. E. enthielt (Nr. 4 der Tab. 20), war nach 5 Tagen vollkommen unwirksam geworden. Leberpreßsaft verlor in 5 Tagen $^6/_7$ seiner Wirksamkeit (Nr. 5 der Tab. 20). Die Beständigkeit des Enzyms in den dialysierten Auszügen wird durch Zusatz von etwas Essigsäure wesentlich erhöht. In schwach alkalischer Lösung ist die Haltbarkeit noch geringer als bei neutraler Reaktion (Nr. 10 u. 12 der Tab. 20)[45]).

---

[45]) Vgl. damit die wesentlich höhere Empfindlichkeit des milchsäurebildenden Fermentes (aus zerkleinerter Froschmuskulatur gewonnen) von O. Meyerhof, Naturw. **14**, 196 (1926).

Tabelle 20.

Beispiele für die Haltbarkeit des Enzyms.

Nr.	Alter der E-Lösung	ccm E-Lsg. angew.	Gesamtvolumen	p_H	Einwirkungsdauer (Stdn.)	ccm n/10-Jod		Joddifferenz	Methylglyoxal		Proz. Umsatz	Gl.-E. in 100 ccm		Proz. Abnahme der Gl.-E.
						Hauptvers.	Kontr.-Vers.		gef.	angew.		gef.	angew.	
1[1])	1 Woche	10,0	25	6,8	40	21,50	17,20	4,30	6,5	15,0	57	1,1	3,5	69
2	1 Woche	5,00	20	8,0	2	12,56	9,56	3,00	10,8	13,7	21	8,3	18	54
3	3 Tage	10,0	22	8,5	$2^1/_2$	14,04	11,72	2,32	8,4	9,8	15	1,8	15	88
4	5 Tage	10,0	25	7,5	$2^1/_2$	17,20	15,00	2,20	7,8	7,8	0	0	28	100
5	5 Tage	2,0 Preßsaft	9	7,5	$2^1/_2$	21,69	20,60	1,09	3,9	7,8	50	52,5	364,0	85,6
6	5 Tage	3,3	10	7,35	$6^1/_2$	7,23	3,12	4,11	14,8	16,3	9,5	0,24	8,8	97,3
7	1 Tag	10,0	27	7,5	$3^2/_3$	12,27	9,00	3,27	11,8	15,1	22	2,78	8,0	65,4
8	$2^1/_2$ Tage mit 6 Tropfen n/10-CH_3CO_2H	15,0	27	8,5	16	6,08	5,40	0,68	2,4	9,8	75	1,38	3,5	60,5
9	$2^1/_2$ Tage mit 6 Tropfen n/10-Na_2CO_3	15,0	27	8,5	16	6,49	5,10	1,39	5,0	9,8	49	0,7	3,5	80
10	Dialysat, 3 Tage schwach alkalisch	10,0	22	9,0	$4^3/_4$	3,64	1,47	2,17	7,8	9,8	20[2])	0,4	3,7	89
11	Dialysat, 3 Tage schwach sauer	10,0	22	9,0	$4^3/_4$	3,00	1,50	1,50	5,4	9,8	45[2])	2,4	3,7	35
12	Dialysat, 3 Tage neutral	10,0	22	9,0	$4^3/_4$	4,00	1,53	2,47	8,9	9,8	10[2])	0,64	3,7	83

[1]) Nr. 1 nach Willstätter-Schudel titriert, Umrechnungsfaktor für das vorliegende Methylglyoxalpräparat gesondert ermittelt.

[2]) Nr. 10—12 wegen OH'-Katalyse korrigiert.

4. Versuch mit Takadiastase; Wirksamkeitsvergleiche.

Es wurden 1 g Takadiastase (von Sankyo & Co., Tokio) in 20 ccm Wasser gelöst. Von der mit Toluol überschichteten Lösung ließ ich 2,0 ccm (entsprechend 0,1 g Takadiastase) auf 10,1 mg Methylglyoxal in 10,0 ccm Reaktionsgemisch bei pH = 7,0, 30° einwirken. Nach 5stündiger Versuchsdauer zeigte die jodometrische Titration des noch vorhandenen Ketoaldehyds, daß keine Milchsäure gebildet wurde, mithin die angewandte Takadiastase ohne glyoxalatische Wirkung war.

Einen interessanten Vergleich zwischen verschiedenen Glyoxalase-Lösungen aus derselben Tierleber, aber nach wechselnder Art der Zubereitung gewonnen, bietet Tab. 21. Eine Anzahl Gründe sprachen dafür, daß die Glyoxalase von einer an Glykogen oder verwandten Polysacchariden verankerten Form aus ihre Wirksamkeit entfalte. Eine Freilegung des Enzyms müßte danach eine sehr hochwertige — Gl. E. reiche — Lösung liefern. Es wurde deshalb ein der Extraktion der Leber vorausgehender diastatischer Abbau unternommen. Unsere Vermutung bestätigte sich nicht, im Gegenteil die nicht mit Diastase vorbehandelten Leberauszüge waren wesentlich wirksamer (Nr. 1 u. 3 der Tab. 21). In den dialysierten Lösungen (Nr. 2 u. 4 der Tab. 21) sank die Anzahl Gl. E. in 100 ccm Enzymlösung beträchtlich, während der Glyoxalasewert in Versuch Nr. 2 z. B., sich von Gl.W. = 8,4 auf 9,4 hob. Bemerkenswert scheint der gute Effekt mit so konzentrierten Enzymlösungen, wie wir es in dem angeführten Beispiele mit einem Preßsafte erzielt haben.

Der Gehalt von 364 Gl. E. in 100 ccm Enzymlösung repräsentiert den Rekordwert aller gewonnenen Glyoxalase-Lösungen.

Tabelle 21.

Diastatischer Abbau und Preßsaft.

Enzym: Schweineleberauszug (1:4). In jedem Falle 21,0 mg Methylglyoxal in 20,0 ccm Gesamtvolumen; pH = 7,5, 30°, Einwirkungsdauer 20 Stdn.

Nr.	Enzym ccm	Vorbehandlung	Dialyse Std.	% Trockengew.	ccm n/10 Jod Haupt-Vers.	ccm n/10 Jod Kontr.-vers.	Jod Diff.	Methylglyoxal gef. mg	% Ums.	in 100 ccm Enzym-Lösung Gl.-E.	in 100 ccm Enzym-Lösung Gl.-W.
1	10,0	—	—	3,32	4,00	4,03	−0,03	0,0	**100**	ca. 28	8,4
2	10,0	—	16	2,00	4,96	3,52	1,44	5,2	**75,2**	18,8	9,4
3	10,0	+ 0.05 g Diastase	—	2,62	21,32	18,40	2,92	10,5	**50**	4,8	1,84
4	10.0	do.	16	0,54	9,80	3,95	5,85	21.1	**0,0**	0,0	0,0
5	1,0 Preß.	—	—	**22,24**	8,21	7,40	0,81	2,9	**86,2**	**364**	**16,4**

VI. Kapitel.

Mandelsäurebildung aus Phenylglyoxal.

A. Phenylglyoxaldarstellung.

Die Gewinnung des Phenylglyoxals erfolgte nach den Vorschriften von H. Müller und H. v. Pechmann[46]).

Nach L. Claisen und O. Manasse[47]) wird zunächst aus Acetophenon mittels Isoamylnitrit und Natrium-alkoholat Isonitroso-acetophenon-natrium dargestellt, bei 0° mit der theoretischen Menge Eisessig das freie Isonitroso-acetophenon gewonnen. Dies wird mit einer 35%igen Natriumbisulfit-Lösung verkocht, und die schneeweiße Bisulfitverbindung mit 17%iger Schwefelsäure zum kristallisierten Phenylglyoxal-monohydrat zersetzt.

Zahlreiche Ansätze wurden ausgeführt, wobei wir abwechselnd von $^3/_{10}$ Mol, $^4/_{10}$ und $1^1/_4$ Mol Acetophenon ausgingen. In letzterem Falle wurden 189 g Isonitroso-acetophenon-natrium erhalten (88% der Th.) und hieraus 80 g freies, kristallisiertes Isonitroso-acetophenon (43% d. Th.). Die nach zweimaligem Umkristallisieren in trockenem Essigester gebildeten großen, schwach gelbgefärbten Nadeln zeigten den Sm. P. von 125° (unkorr.).

30 g dieser Nitroso-Verbindung wurden dann mit 120 g einer 35%igen Natriumbisulfit-Lösung — SO_2 frei —[48]) unter Zusatz von 1 ccm n/10 Na-OH in einem Rundkolben geschüttelt. Nach längerem Stehen erwärmte sich das Reaktionsgemisch, das auf dem Wasserbade kurz bis zur vollständigen Klärung gebracht wurde.

---

[46]) Chem. Ber. **20**, 2904 (1887), **22**, 2556 (1889).

[47]) Chem. Ber. **20**, 656, 2194 (1887).

[48]) A. Pinner, Chem. Ber. **35**, 4131 (1902), **38**, 1531 (1905).

Nach dem Abkühlen erfolgte Erstarren des Breies. Mit 1 ccm Eisessig und viel 96%igem Alkohol wird nun zu einem dünnflüssigen Brei angerührt und nach längerem Stehen abgesaugt. Die weiße Bisulfitverbindung wird mit Alkohol und etwas Äther nachgewaschen. Ausbeute: 50 g.

47 g hiervon wurden nun mit der 9fachen Menge 17%iger H_2SO_4 (423 g) zersetzt; zunächst $^1/_7$ des Gesamtvolumens der klaren Lösung abgedampft. Vertiefung der Färbung ins Grünliche und Trübung der Lösung zeigen den Endpunkt des Eindampfens gleichzeitig an. Man filtriert und regt die klare Lösung sofort im Eis zur Kristallisation an. Zusatz von wenigen Tropfen Ligroin (Frakt. 40°—70°) sind zweckdienlich zur Beschleunigung des Kristallisationsprozesses und zur Vermeidung eines ölig auftretenden Substrates. Die Mutterlaugen ergeben — nach weiterem zweimaligen Eindampfen — in der Regel noch weitere Portionen Phenylglyoxal.

Es wurden bei diesem Ansatz im ganzen 10,1 g Phenylglyoxal gewonnen (33% d. Th.).

Als Nebenprodukt konnte die in weißen Nadeln kristallisierende Phenylglyoxalin-sulfosäure isoliert werden.

Unser Phenylglyoxal besaß einen Sm. P. von 75—76°. Es reduzierte ammoniakalische Silberlösung zum Silberspiegel. Beim Versetzen der wäßrigen Lösung bewirkte Zusatz von wenig konzentriertem Ammoniak das bekannte Auftreten von 5-Phenyl-2-benzoyl-glyoxalin[49]).

Bei der Isolierung und Bestimmung der gebildeten Mandelsäure hielt ich mich an die Angaben von H. D. Dakin und H. W. Dudley[50]). Die Stoppung der Enzymreaktion erfolgte durch Zusatz überschüssiger Phosphorsäure (10 ccm 25%iger H_3PO_4 auf 100 ccm Reaktionsgemisch).

---

[49]) Siehe A. Pinner, l. c. **48** S. 1532/33.

[50]) Jl. Biol. Chem. **14**, 423 (1913), und zwar 427.

Die beim Verdunsten der Ätherauszüge[51]) rosettenförmig auskristallisierende Mandelsäure wurde zur Polarisation jeweils in 10 ccm Wasser gelöst.

B. Kinetik der Mandelsäurebildung.

Als optimale Wasserstoffzahl fand ich ein ziemlich weites Gebiet zwischen pH = 7,5 und pH = 9. Der günstigste Punkt nach Fig. 6 scheint in der Nähe von pH = 8,2 zu liegen.

Auszug aus frischer Schweineleber mit 4½ Teilen Wasser bereitet. Je 70 ccm Enzym + 30 ccm m/5 Phosphat + 0,193 g Phenylglyoxal. Gesamtvolumen 111 ccm; Reaktionsdauer 17 Stunden; 30°. Stoppung durch Zusatz von je 6 ccm 25%iger Phosphorsäure. Das Drehungsvermögen der mit Puffer gestandenen Enzymlösungen allein war unmeßbar gering.

PH:	5,5	6,5	7,0	7,5	8,0	9,0
α_D (2 dm-Rohr):	— 0,00°	—0,63°	—0,77°	—0,87°	—0,93°	—0,86°

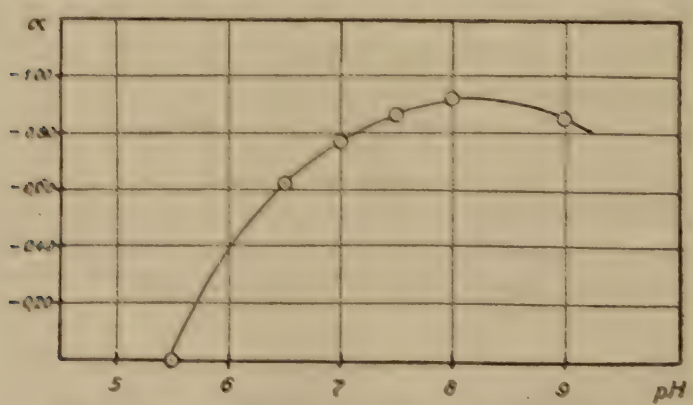


Fig. 6. Phenylglyoxalase-Wirkung bei wechselndem p_H

Einfluß der Substratkonzentration bei pH = 7,5.

80 ccm Enzym + 30 ccm Puffer + Substrat zu 126 ccm; 20½ Stunden, 30°.

[51]) Mit Natriumsulfat getrocknet.

Phenylglyoxalhydrat (g in 126 ccm):	0,10	0,20	0,40
„ Mol/Liter:	0,0052	0,0104	0,0208
α_D (2 dm-Rohr):	−0,95°	−1,68°	−2,72°

70 ccm Enzym + 30 ccm Puffer + Substrat zu 122 ccm; 17 Std.

Phenylglyoxalhydrat (g in 122 ccm):	0,19	0,38
„ Mol/Liter:	0,0102	0,0204
α_D (2 dm-Rohr):	−0,87°	−1,47°

Der zeitliche Verlauf der Mandelsäurebildung ist von Enzymlösung zu Enzymlösung verschieden. Im allgemeinen nimmt der Umsatz, wie es Fig. 8 zeigt, selbst bei mehrtägiger Reaktionsdauer stetig zu, ohne daß eine bestimmte Umwandlungsgrenze zu erkennen ist. Die größten beobachteten Umsätze entsprechen aber nur etwa 25% d. Th. an linksdrehender Mandelsäure bzw. 50% d. Th. an aktiver + racemischer Oxysäure[52]). Auffallend ist der Reaktionsverlauf bei Anwendung des Preßsaftes (Fig. 7). Die Umwandlung bleibt in diesem Falle bei etwa 10% stehen.

450 ccm Enzym + 100 ccm m/5 Phosphat pH = 7,5 + 1,22 g Phenylglyoxal in 65 ccm H_2O; zur Bestimmung je 100 ccm entnommen. 30°.

Zeit (Std.):	$1^1/_2$	$2^1/_2$	$6^1/_2$	$18^1/_2$	67
α_D (2 dm-Rohr):	−0,06°	−0,11°	−0,24°	−0,50°	−0,90°
% (−) Mandels. (gef.):	1,0	1,9	4,0	8,4	15,0

20 ccm Preßsaft aus Schweineleber + 13 ccm m/5-Phosphat + 1,08 g Phenylglyoxal in 30 ccm; zur Bestimmung je 10 ccm entnommen. 30°. (Fig. 7.)

Zeit (Std.):	$1^1/_2$	$3^3/_4$	$5^3/_4$	7	19	42
α_D (2 dm-Rohr):	−0,33°	−0,44°	−0,47°	−0,48°	−0,48°	−0,50°
% (−) Mandels. gef.:	6,4	8,6	9,1	9,3	9,3	9,7

320 ccm Enzym + 75 m/5 Phosphat pH = 7,75 + 1,26 g Phenylglyoxal in48 ccm; zur Polarisation wurden je 110 ccm entnommen. 30°. (Fig. 8.)

---

[52]) Vgl. R. Kuhn und E. Werle, Bestimmung der Gesamtmandelsäure.

Zeit (Min.):	0	100	240	500	1200
α_D (2 dm-Rohr):	$\pm$ 0,00°	−0,40°	−0,86°	−1,36°	−2,13°
% (−) Mandels. gef.:	$\pm$ 0,0	4,4	9,6	15,2	23,7

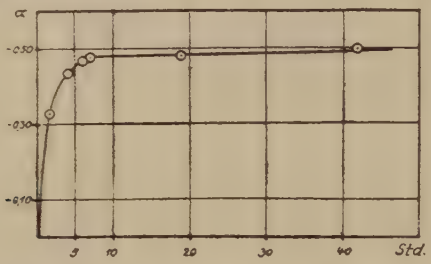


Fig. 7. Reaktionsverlauf bei Anwendung von Leberpreßsaft.

Die Haltbarkeit der Phenylglyoxalase-Lösungen ist eine geringe. Bei Zimmertemperatur nahm die Wirksamkeit in 15 Std. etwa um die Hälfte ab.

Mit 0,3 g Substrat ergeben sich z. B. bei 26stündiger Einwirkung für frisches Enzym $\alpha_D = -1{,}09°$, Enzym 15 Stunden aufbewahrt $\alpha_D = -0{,}52°$, nach 63 Stunden $\alpha_D = -0{,}21°$. Eine andere Enzymlösung sofort verwendet $\alpha_D = -1{,}90°$, nach 15 Stunden $\alpha_D = -0{,}90°$.

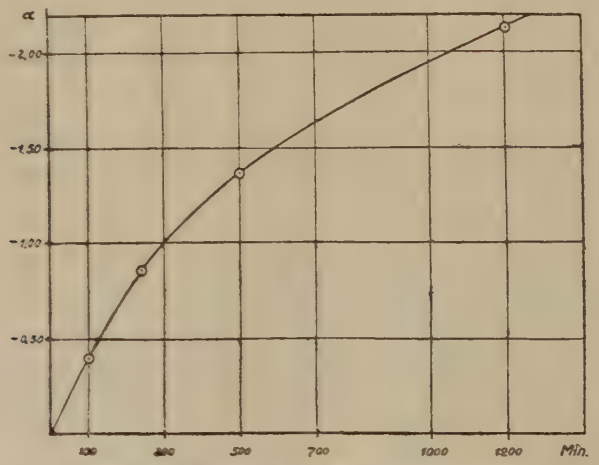


Fig. 8. Kinetik der Mandelsäurebildung.

VII. Kapitel.

Aktivatoren und Hemmungskörper der Glyoxalase.

Die Methodik der reaktionskinetischen Messungen ist in den voranstehenden Kapiteln ausführlich beschrieben. Die Enzymlösungen sind, wenn nichts anderes angegeben, wäßrige Auszüge aus Schweineleber.

A. Versuche mit Insulin.

Die Anzahl neuer klinischer Einheiten[53]) in je 1 mg der angewandten Insulinpräparate betrug:

Insulin Lilly . . .	10,0	Insulin Organon Oss . . .	1,1
Insulin „A.B." . .	7,4	Insulin Schering	0,95

Kristallisiertes Insulin enthält nach J. J. Abel[54]) 100—125 Einheiten pro mg.

Daß Methylglyoxal ebensowenig wie Glucose in wäßriger Lösung durch Insulin verändert wird, zeigen die jodometrischen Bestimmungen der Tab. 22. Der Reduktionswert der Gemische entspricht auch nach längerem Stehen genau der Summe des Jodverbrauchs für Methylglyoxal allein und für Insulin allein.

---

[53]) A. Grevenstuk u. E. Laqueur, Insulin, München (J. F. Bergmann) 1925, S. 158 ff. Definition VI nach E. Laqueur, Klin. W. 3. Jahrg. S. 440 (1924). Unsere obigen Angaben sind abgeleitet aus den Angaben der einzelnen Fabriken über die Wirkungsstärke pro 1 ccm und aus dem Trockengehalt der Lösungen, den wir selbst bestimmten.

[54]) Proc. Nat. Acad. Sciences **12**, 132 (1926).

Tabelle 22.

Methylglyoxal und Insulin.

Ansätze: Nr. 1 9,58 mg Methylglyoxal + 10 ccm m/5 Phosphat pH = 7,5 + 5 Einheiten Insulin Schering I zu 19 ccm; Einwirkungsdauer 3 Stunden bei 30°; die Kontrollversuche „Insulin allein" und „Methylglyoxal allein" sind bei gleichem pH und Reaktionsvolumen ausgeführt. — Nr. 2. Mit 10 Einheiten Insulin Schering I. — Nr. 3. Mit 2,5 Einheiten. — Nr. 4. Mit 8 Einheiten Insulin Organon Oss. — Nr. 5. 12,7 mg Methylglyoxal + 10 ccm m/5 Phosphat pH = 7,5 + 8 Einheiten Insulin Schering II zu 18 ccm; Einwirkungsdauer 5½ Stunden bei 30°.

Jodverbrauch in ccm n/10-Lösung.

Nr.	Methylglyoxal allein	Insulin allein	Methylgl. + Insulin	
			gef.	ber.
1	2,66	0,18	2,82	2,84
2	2,66	0,36	3,00	3,02
3	2,66	0,11	2,77	2,77
4	2,66	0,36	2,99	3,02
5	3,54	0,16	3,72	3,70

Der Reduktionswert der Enzymlösungen wird, namentlich bei längerer Versuchsdauer, durch das Insulin in manchen Fällen ein wenig erniedrigt, in anderen etwas erhöht, so daß immer ein Kontrollversuch ohne Substrat auszuführen ist.

In Tabelle 23 stelle ich Beispiele für die Hemmung der Methylglyoxalase durch verschiedene Insulinpräparate zusammen. In der vorletzten Spalte ist die Anzahl Glyoxalase-Einheiten angegeben, die sich nach der Zeit-Umsatzkurve (siehe Kap. V Fig. 4) berechnet. Die letzte Spalte gibt Prozente Hemmung, ausgedrückt in Glyoxalase-Einheiten, an. Die hemmende Wirkung eines bestimmten Insulin-Präparates ist nicht nur von der Menge der vorhandenen Enzym-Einheiten, sondern auch von der Natur der benützten Enzymlösung abhängig. In den Preßsäften ist das Enzym hemmenden Einflüssen anscheinend leichter zugänglich als in den wäßrigen Auszügen (vgl. z. B. Tab. 23 Nr. 3 u. 7).

Tabelle 23.

Hemmung der Methylglyoxalase durch verschiedene Insulinpräparate.

Nr.	Enzym (ccm)	Angew. Insulinpräparat	p_H	Ges.-Vol. ccm	Einw.-dauer Std.	ccm n/10-Jod Hauptversuch	ccm n/10-Jod Kontr.	Diff. ccm n/10-Jod	Methylgl. (mg) gef.	Methylgl. (mg) angew.	Proz. Umwandlung	Gl.-E.in 100 ccm Enzymlösung	Prozent Abnahme (Gl.-E.)
1	2,00 Preß.	—	7,5	9,00	2 1/6	22,52	21,33	1,19	4,3	7,8	45	48,7	—
2	2,00 „	40 Einh. Germano	7,5	9,00	2 1/6	23,80	21,60	2,20	7,9	7,8	0,0	0,0	100
3	2,00 „	20 „ Schering	7,5	9,00	2 1/6	23,89	21,70	2,19	7,9	7,8	0,0	0,0	100
4	2,00 „	—	7,5	12	4	27,51	23,28	4,23	15,2	19,4	22	28.6	—
5	2,00 „	5 „ „	7,5	14,5	4	29,05	24.25	4.80	17,3	19,4	11	8,0	72
6	10,0 Auszug	—	7,5	35	3 4/5	15,97	14,10	1,87	6,7	11,9	44	4,2	—
7	10,0 „	20 „ „	7,5	35	3 4/5	16,81	14,30	2,51	9,0	11,9	24,6	2,3	45
8	10,0 „	—	7,5	25	6	12,10	9,10	3,00	10.8	15,1	28	2,3	—
9	10,0 „	10 „ „	7,5	30	6	16,82	9,40	7.42	26,7	30,2	11,7	1,4	39
10	10,0 „	—	7,5	35	18	12,20	10,20	2,00	7,2	15,1	52	1,6	—
11	10,0 „	20 „ „	7,5	35	18	13,43	10,16	3,27	11,8	15,1	22	0.6	62,5
12	10,0 „	—	7,5	24	3 1/6	13,15	9.81	3.34	12.2	13.9	13,5	1,6	—
13	10,0 „	4 „ Bayer	7,5	24	3 1/6	13,19	9,79	3.40	12,0	13,9	11,9	1,3	18,8
14	10,0 „	20 „ „	7,5	24	3 1/6	13,77	10,00	3,77	13,6	13,9	2,4	0,4	75
15	10,0 „	—	7,5	25	6	12,10	9,10	3,00	10,8	15,1	28	2,3	—
16	10,0 „	15 „ Org. Oss	7,5	30	6	12,80	9,30	3,50	12,6	15,1	16,7	1,26	45
17	10,0 „	10 „ A. B. II	7,5	30	6	13,12	9,40	3,72	13,4	15,1	11,4	0,66	71,3
18	10,0 „	—	7,5	32	20	14,29	12,78	1,51	5,44	24,0	77,3	9,8	—
19	10,0 „	40 „ A. B. I	7,5	32	20	17,09	14.75	2.34	8,42	24,0	64,9	6,1	37,8
20	10,0 „	—	7,5	32	20	14,41	12,78	1,63	5,87	24,0	75,6	9,2	—
21	10,0 „	40 „ Lilly	7,5	32	20	15,11	13,49	1,62	5,83	24,0	75,7	9,2	0,0

Besondere Versuche haben gelehrt, daß eine Inkubation von Enzym und Insulin vor Zugabe des Substrats — selbst wenn sie auf mehr als 4 Stunden ausgedehnt wird — den Hemmungseffekt auf die Milchsäurebildung nicht zu steigern vermag.

Die Mandelsäurebildung aus Phenylglyoxal wird nach den Tabellen 24 und 25 durch die einzelnen Insulinpräparate in ähnlicher Weise beeinflußt wie die Methylglyoxal-Reaktion. In quantitativer Hinsicht finden wir, daß bei annähernd gleichem Verhältnis von Enzym zu Insulin die Cannizzaro-Reaktion beim Phenylglyoxal etwas weniger gehemmt wird als beim Methylglyoxal. Wir erwarteten das Gegenteil, da die Affinität der Glyoxalase zum Phenylglyoxal erheblich niedriger ist als zur Methylverbindung, möchten aber dem gefundenen Unterschied keine größere Bedeutung beimessen, weil es sich nicht um unmittelbare Vergleiche handelt, die mit ein und derselben Enzymlösung angestellt sind.

Insulin Lilly, das ohne Einfluß auf die Milchsäurebildung ist (Tab. 23 Nr. 20 u. 21), hemmt auch die Disproportionierung des Phenylglyoxals nicht (Tab. 25 Nr. 7 u. 8). Von den beiden „A.B."-Präparaten ist I, das beim Methylglyoxal nur geringe Wirkung zeigte, beim Phenylglyoxal wirkungslos, II hemmt Milchsäure- wie Mandelsäurebildung bedeutend (Tab. 24 Nr. 10—12 u. 14—16).

Tabelle 24.

Phenylglyoxalase und Insulin.

Die Mandelsäure aus jedem Ansatz in 10 ccm Wasser gelöst und im 2 dm-Rohr polarisiert.

Nr.	Enzym (ccm)	Zusatz	p_H	Phenylgl. (g)	Ges.-Vol. (ccm)	Einwirkungsdauer (Std.)	αD (°)	% Hemmung
1	80	—	7,5	0,144	155	15	— 1,05	—
2	80	—	7,5	—	155	15	+ 0,05	—
3	80	100 Einh. Schering	7,5	0,144	155	15	— 0,75	28,6
4	80	100 „ „ gekocht	7,5	0,144	155	15	— 1,07	0,0
5	100	—	7,65	0,385	157	22½	— 1,90	—

Nr.	Enzym (ccm)	Zusatz	p_H	Phenylgl. (g)	Ges.-Vol. (ccm)	Einwirkungsdauer (Std.)	αD (°)	% Hemmung
6	100	100 Einh. Schering	7,65	0,385	157	$22^1/_2$	— 1,35	29
7	100	100 „ „ gekocht	7,65	0,385	157	$22^1/_2$	— 1,83	3,7
8	80	—	8,0	0,250	125	20	— 1.43	—
9	80	100 Einh. Schering	8,0	0,250	125	20	— 1,10	23,1
10	50	—	7,5	0,200	125	$17^1/_2$	— 0,62	—
11	50	—	7,5	0,200	125	$17^1/_2$	— 0,60	—
12	50	70 Einh. A. B. Brand II	7,5	0,200	125	$17^1/_2$	— 0,31	50
13	50	70 „ Schering	7,5	0,200	125	$17^1/_2$	— 0,46	25
14	75	—	7,5	0,400	155	$17^1/_2$	— 2,13	—
15	75	40 „ A. B. Brand II	7,5	0,400	155	$17^1/_2$	— 1,99	6,6
16	75	100 „ „ „ „ II	7,5	0,400	155	$17^1/_2$	— 1,80	15,5
17	75	100 „ „ „ „ II gekocht	7,5	0,400	155	$17^1/_2$	— 2,05	3,7

Tabelle 25.

Gereinigtes Insulin ist ohne Einfluß.

Gesamte Mandelsäure in 10 ccm Wasser gelöst und im dm-Rohr polarisiert.

Nr.	Enzym (ccm)	Zusatz	p_H	Phenylgl. (g)	Ges.-Vol. (ccm)	Einwirkungsdauer (Std.)	αD (°)	% Hemmung
1	50	—	7,5	0 277	115	18	— 0,98	—
2	50	—	7,5	0,277	115	18	— 1,00	—
3	50	—	7,5	—	115	18	± 0,00	—
4	—	67 Einh. Organon Oss *)	7,5	0,277	115	18	± 0,00	—
5	50	45 „ „ „	7,5	0,277	115	18	— 0,98	0,0
6	50	90 „ „ „	7,5	0,277	115	18	— 0,99	0,0
7	75	—	7,65	0,300	120	25	— 1,09	—
8	75	50 „ Lilly	7,65	0,300	120	25	— 1,09	0,0
9	80	—	7,75	0,300	110	1^{40}	— 0,40	—
10	80	50 „ A. B. Brand I	7,75	0,300	110	1^{40}	— 0,41	0,0
11	80	—	7,75	0,300	110	4^{00}	— 0,86	—
12	80	50 „ „ „ „ I	7,75	0,300	110	4^{00}	— 0,87	0,0
13	80	—	7,75	0,300	110	8^{20}	— 1,36	—
14	80	50 „ „ „ „ I	7,75	0,300	110	8^{20}	— 1,37	0,0
15	80	—	7,75	0,300	110	20^{00}	— 2,13	—
16	80	50 „ „ „ „ I	7,75	0,300	110	20^{00}	— 2,13	0,0

*) Zur Wirksamkeitskontrolle wurde dies Präparat vorher an zwei 26 Std. nüchternen Meerschweinchen ausprobiert. Subcutane Injektion einer Lösung von je 50 klin. Einh. Org. Oss in 5 ccm Wasser löste in beiden Fällen nach 1—$1^1/_4$ Std. die bekannten Symptome des hypoglykämischen Effektes aus.

Durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen der unreinen Insulinlösungen auf etwa 90° wird die Antiglyoxalasewirkung zerstört (Tab. 24 Nr. 4, 7 u. 17).

B. Co-Zymase.

Die Co-Zymaselösungen wurden durch $^1/_2$ stündiges Kochen von Hefe mit 1—$1^1/_2$ Teilen Wasser bereitet. Zu den Versuchen diente das mit Toluol versetzte klare Filtrat. Bei der Darstellung von Co-Zymase aus frischem Muskel hielt ich mich an die Angaben von O. Meyerhof[55]).

Läßt man Hefe- oder Muskelkochsaft auf Methylglyoxallösung einwirken, so macht sich eine zeitliche Abnahme des Reduktionswertes bemerkbar, die beim Muskelkochsaft sehr bedeutend ist. In 20 Stunden verschwinden z. B. bei 30° von 7,2 mg Methylglyoxal nahezu $^2/_3$, von 14,4 mg über die Hälfte.

Methylglyoxal + Muskelkochsaft.

Je 5 ccm Muskelkochsaft (aus Kalbslende) auf 7,2 mg Methylglyoxal, Versuchsdauer $21^1/_2$ Stunden, 30°, pH = 7,5.

Nr.	ccm n/10 Jod		Diff. Jod	Methylgl. (mg)		Proz. verschw. Methylglyoxal
	Hauptvers.	Kontrollvers.		gef.	angew.	
1	6,06	5,37	0,69	2,5	7,2	$65^1/_2$
2	7,25	5,48	1,77	6,4	14,4	56

Berücksichtigt man diesen Effekt bei den Enzymversuchen, so ergibt sich keine Aktivierung. Es findet im Gegenteil wie bei den Versuchen mit Phenylglyoxal (Tab. 27) Hemmung statt. Im folgenden Beispiel wird der Umsatz durch den Muskelkochsaft von $26^1/_2$% auf 59% erhöht. Der Kontrollversuch ohne Enzym liefert aber nahezu denselben Umwandlungsgrad, nämlich 56%.

Es liegt offenbar eine nicht enzymatische Reaktion zwischen Keto-aldehyd und Bestandteilen des Kochsaftes vor.

---

[55]) H. **101**, 165 (1918) u. **102**, 1 (1918).

Tabelle 26.

Die Einwirkung von Glyoxalase und Muskelkochsaft auf Methylglyoxal.

Nr.	Enzym ccm	Zusatz	pH	t	Ges.-Vol.	ccm n/10 Jod H.-V	ccm n/10 Jod K.-V.	Diff. Jod	Methylgl. gef.	Methylgl. angw.	% U.	Gl.-E. in 100 ccm
1		—	7,5	16	30	12,44	9,50	2,94	10,6	14,4	26½	0,72
2	10,0 10,0	6 cm Muskel-kochsaft	7,5	16	30	16,47	14,84	1,63	5,9	14,4	59	—
3	—	„	7,5	16	30	7,17	5,40	1,77	6,4	14,4	56	

Hefekochsaft aus 80 g frischer Branntweinhefe, mit 125 ccm Wasser, ¼ Stunde gekocht.

Bei pH = 7,5 wurden 7,2 mg Methylglyoxal 15 Stunden lang der Einwirkung von je 5 ccm dieses Hefekochsaftes ausgesetzt; 30°.

Nr.	ccm n/10 Jod Haupt-V.	ccm n/10 Jod Kontroll-V.	Diff. Jod	Methylgl. (mg) gef.	Methylgl. (mg) angew.	% verschw. Methylglyoxal
1	4,08	2,50	1,58	5,7	7,2	21
2	4,03	2,50	1,53	5,5	7,2	23½

Je 7,0 ccm Muskelkochsaft, pH = 7,5; 30°; auf 18,0 mg Methylglyoxal. Gesamtvolumen 22 ccm, davon je 10,0 ccm für die Titration entnommen.

Nr.	ccm n/10 Jod Haupt-V.	ccm n/10 Jod Kontroll-V	Einw.-dauer Std.	Diff. Jod	Diff. corrig. f. 22 ccm	Methylgl. (mg) gef.	Methylgl. (mg) angew.	% verschw. Methylglyoxal
1a)	3,91	2,25	4	1,66	3,65	13,1	18,0	27
b)	3,00	2,03	21	0,97	2,13	7,7	18,0	57
2a)	3,94	2,28	4	1,66	3,65	13,1	18,0	27
b)	3,00	2,03	21	0,97	2,13	7,7	18,0	57

Bei der Phenylglyoxal-Umlagerung bewirkt Zusatz von Cozymase-Lösungen (Tab. 27) meist geringfügige Reaktionsverzögerung (0—17% Hemmung).

Die Hemmung durch Pankreaspräparate prüften wir mit einem aus der Bauchspeicheldrüse des Schweines nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz[56]) dargestellten

[56]) H. **125**, 132 (1922/23), und zwar 148.

Tabelle 27.

Wirkung von Antiglyoxalase und von Co-Zymasen auf die Mandelsäurebildung.

Die Mandelsäure aus jedem Versuch in 10 ccm Wasser gelöst. Drehungswinkel im 2 dm-Rohr.

Nr.	Enzym ccm	Zusatz	pH	Phenylgl. (g)	Ges. Vol. ccm	Einw.-Dauer (Std.)	$(^0)\ \alpha_D$	Proz. Hemmung
1	80	—	7,75	0,250	125	20	— 1,43	—
2	80	0,2 g Pankreaspulver	7,75	0,250	125	20	— 0,69	52
3	80	do. (m. Alkali behandelt)	7,75	0,250	125	20	— 0,90	37
4	75	—	7,65	0,300	119	25	— 1,09	—
5	75	0,2 g Pankreaspulver	7,65	0,300	119	25	— 0,39	64,2
6	75	—	7,65	0,300	119	46½	— 0,78	
7	75	0,2 g Takadiastase	7,65	0.300	119	46½	— 0,32	59
8	100	—	7,65	0,385	157	22½	— 1,90	—
9	100	0,2 g Papain	7,65	0,385	157	22½	— 1,69	11
10	80	—	7,5	0,300	110	20	— 1,86	—
11	80	5 ccm Hefekochsaft (Löwenbräu trocken)	7,5	0,300	110	20	— 1,68	9,7
12	—	do.	7,5	0,150	110	20	— 0,11	—
13	80	10 ccm Muskelkochsaft (Kalb)	7,5	0,300	110	20	— 1,54	17
14	—	do.	7,5	0.150	110	20	± 0,00	—
15	100	—	7,65	0,385	157	22½	— 1,90	—
16	100	—	7,65	—	157	22½	— 0,06	—
17	100	20 ccm Muskelkochsaft (Schwein)	7,65	0 385	157	22½	— 1,67	12
18	100	20 ccm Muskelkochsaft (Taube)	7,65	0,385	157	22½	- 1,94	0,0
19	100	20 ccm Hefekochsaft (Löwenbräu frisch)	7,65	0,385	157	22½	— 1,79	5,8
20	100	20 ccm Hefekochsaft (Sinner frisch)	7,65	0,385	157	22½	— 1,75	7,9
21	100 (gealt. Enzym)	—	7,65	0,481	157	29½	— 1,21	—
22	100 (gealt. Enzym)	20 ccm Leberkochsaft (Schwein)	7,65	0,481	157	29½	— 1,41	—16,5

Trockenpulver. 1 g enthielt 80 Trypsin-Einheiten. Durch 18-stündige Behandlung dieses Pulvers mit 50 Teilen 1%iger Sodalösung bei 30° erhielten wir das zu Vers. 3 benützte Produkt. Der Hemmungseffekt ging von 52 auf 37% zurück, der Trypsingehalt sank auf etwa 70%. Starke Hemmung bzw. Enzymzerstörung bewirkte Zusatz von „Takadiastase" (von Sankyo & Co., Tokio, Vers. 6 u. 7), während Papain[57]) (Succus carycae papayae, E. Merck) ohne bedeutenden Einfluß war[58]). (Tabelle 27.)

Die Wahrnehmung von D. L. Foster[59]), daß in Gegenwart von Antiglyoxalase das Reaktionsgemisch eine tiefe Orangefärbung annehme, konnte ich in keinem Falle bestätigen. Foster wollte mit ihrer „orange deep colour" die Hemmung der Mandelsäurebildung so auszulegen versuchen, als ob eine Beeinflussung des Phenylglyoxals selbst durch die Antiglyoxalase vorläge. Sie belegt ihre Vermutung mit der Beobachtung, daß die „orange deep colour" schon in Gegenwart von Substrat und Hemmungskörper allein auftrete. Meine Versuche (Tab. 27, Nr. 2, 3, 5 z. B.) zeigten keine Änderung des Farbtons gegenüber den Hauptversuchen ohne Antiglyoxalase.

C. Trennung von Trypsin und Antiglyoxalase.

Geklärter Glycerinauszug aus Schweinepankreas wurde durch sechsmalige Behandlung mit Tonerde $C\gamma$ bei pH = 3,8 nach der Vorschrift von E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck[60]) von Erepsin befreit. Die Restlösung, die zur Prüfung auf Antiglyoxalase diente, enthielt in 5 ccm 5 Trypsin-Einheiten.

---

[57]) Der Versuch 9 (Tab. 27) wurde ohne Aktivierung mit Blausäure ausgeführt.

[58]) Vgl. bezüglich der proteolytischen Wirkung dieses Präparates R. Willstätter u. W. Graßmann, H. **138**, 184 (1924).

[59]) Biochem. Jl. **19**, 757 (1925), und zwar 761. Foster geht sogar soweit, daß sie sagt: „The colour produced was always proportional to the degree of inhibition."

[60]) H. **147**, 286 (1925).

Es war, wie Tab. 28 zeigt, keine Hemmung der Glyoxalase festzustellen.

Pankreaspulver von gleichem Trypsingehalt hätte den Drehungswinkel um mindestens 0,35° erniedrigt.

Tabelle 28.

Enzym: wäßriger Auszug aus frischer Schweineleber (1:4); je 30 ccm m/5 Phosphatpuffer von pH = 7,6; 30°. Keine Inkubationsdauer; Versuchsdauer 22 Stdn.

Nr.	Enzym (ccm)	Zusatz	Phenylgl. (g)	Ges.-Vol. (ccm)	α_D (°) (2 dm-Rohr)
1	80	—	0,3	120	— 1,86
2	80	5 ccm Trypsin	0,3	120	— 1,90
3	80	—	0,3	120	— 1,86
4	80	5 ccm Trypsin + 2 ccm Enterokinase	0,3	122	— 1,85

Die Kinasemenge für Vers. 4 war so bemessen, daß maximale Aktivierung des Trypsins [61]) erzielt wurde.

D. Addition verschiedener Glyoxalasen.

Eine eigenartige Erscheinung beobachtet man, wenn zwei Glyoxalaselösungen verschiedener Herkunft gleichzeitig auf Phenylglyoxal einwirken. Mischt man Leberauszug und Muskelpreßsaft, die für sich allein in gleichen Zeiten nahezu gleichviel d(−) Mandelsäure bilden, so tritt keine Erhöhung des Umsatzes gegenüber dem Versuch mit Muskelpreßsaft allein auf. Bei Anwendung von Leberauszug und glyoxalasehaltigem Autolysat aus Löwenbräuhefe war sogar der Drehungswinkel im Additionsversuch geringer als der mit Leberauszug allein erzielte. Die Ursache der Erscheinung, die nach Bestimmung der Gesamtmandelsäure [62])

[61]) Für Überlassung von Trypsin und Kinaselösung bin ich Herrn Privatdozenten Dr. E. Waldschmidt-Leitz, für die Ausführung der Trypsinbestimmungen Herrn G. Künstner zu großem Danke verpflichtet.

[62]) Nach R. Kuhn u. E. Werle, in noch unveröffentlichten Versuchen.

nicht auf Änderung der optischen Spezifität beruht, ist noch unbekannt. Das Hefe-autolysat hemmt, obwohl es selbst stark aktiv ist.

Tabelle 29.

Gegenseitige Hemmung von Glyoxalaselösungen.

Enzym: Wäßriger Auszug aus frischer Schweineleber (1:4); keine Inkubationsdauer; 30°. Mandelsäure aus jedem Versuch in 10 ccm Wasser gelöst; Lösung im 2-dm-Rohr polarisiert.

Nr.	Enzym (ccm)	Zusatz	pH	Phenylgl. (g)	Gesamtvolumen (ccm)	Einwirkungsdauer (Std.)	αD (°)	Summe in (°) ber.
1	100	—	7,65	0,385	157	$22^1/_2$	— 1,90	—
2	—	20 ccm Hefe-autolysat	7,65	0,385	157	$22^1/_2$	— 0,80	—
3	100	do.	7,65	0,385	157	$22^1/_2$	— 1,64	2,70
4	75	—	7,65	0,300	120	25	— 1,09	—
5	—	8 ccm Muskel-preßsaft	7,65	0,300	120	25	— 1,21	—
6	75	do.	7,65	0,300	120	25	— 1,20	2,30

Das Hefe-autolysat, das zu den Versuchen der Tab. 29 benützt wurde, stellten wir aus 50 g Löwenbräu-Hefe und 20 ccm Wasser unter Zusatz von 5 ccm Chloroform dar. Es wurde fortlaufend mit 1%iger Sodalösung gegen Lackmuspapier neutralisiert und nach etwa 5 Stunden von den Heferückständen abfiltriert. Der Preßsaft wurde aus 80 g Schweinefleisch (Rippenstück) unter Zusatz von Kieselgur in der Buchner-Presse bei 300 Atmosphären gewonnen (Ausbeute 17 ccm).

*) Abgeschlossen Ende Juni 1926.

Abkürzungen.

A. = Justus Liebigs Annalen der Chemie.
Amer. Chem. Jl. = American Chemical Journal, U. S. A.
Amer. Chem. Soc. = The Journal of the American Chemical Society.
Amer. Jl. of Physiol. = American Journal of Physiology.
Biochem. Jl. = The Biochemical Journal, Cambridge.
Bioch. Zs. = Biochemische Zeitschrift.
Bull. soc. chim. = Bulletin de la Société Chimique de France.
C. = Chemisches Zentralblatt.
C. r. = Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences.
C. r. soc. biol. = Comptes rendus des séances de la Société de Biologie, Paris.
Chem. Ber. = Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.
E. P. = Ergebnisse der Physiologie.
H. = Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie.
Jl. Biol. Chem. = The Journal of Biological Chemistry, U. S. A.
Jl. Chem. Soc. = Journal of the Chemical Society, London.
Jl. of Biochem. = The Journal of Biochemistry, Tokyo.
Jl. of Physiol. = The Journal of Physiology, London.
Klin. W. = Klinische Wochenschrift.
Naturw. = Die Naturwissenschaften.
Opp., D. Ferm. = C. Oppenheimer-R. Kuhn, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl., Leipzig, G. Thieme (1924/26).
P. A. = Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie.
Proc. roy. soc. = Proceedings of the Royal Society, London.
Zbl. Physiol. = Zentralblatt für Physiologie.

Lebenslauf.

Am 14. August 1901 wurde ich, Rudolf Heckscher, in Hamburg geboren als Sohn des Kaufmanns Julius Heckscher und seiner Frau Marie geb. Frank. Im Alter von 6 Jahren kam ich zur Schule. Zunächst besuchte ich die Oberrealschule vor dem Holstentore zu Hamburg, später von Oktober 1913 an das Heinrich Hertz-Realgymnasium. Mit der Erlangung des Reifezeugnisses im Herbst 1919 war meine Schulzeit beendet. Noch im Jahre 1919 zog mich ein kurzer freiwilliger Militärhilfsdienst zum Reichswehrbataillon Bahrenfeld.

Mit der Absicht, Jura und Staatswissenschaften zu studieren, ging ich an die Universität Leipzig. Jedoch schon vom zweiten Semester an, Sommer 1920, entschloß ich mich, Chemie zu studieren. Ich übersiedelte an die Universität München, wo ich in das von Herrn Geheimrat Professor Dr. R. Willstätter geleitete Chemische Staatslaboratorium eintrat. Die anorganische Ausbildung genoß ich in der Abteilung von Herrn Professor Dr. L. Vanino. Ende Sommersemester 1922 bestand ich das Verbandsexamen und nach Erledigung der organischen und physikalisch-chemischen Übungen am 2. Juni 1924 ebenso das Doktorandum. Daraufhin war ich mit der Ausführung vorliegender Dissertation beschäftigt, die ich unter Leitung von Herrn Professor Dr. R. Kuhn im Sommer 1926 zu Ende führen konnte. Das Chemiestudium beschloß ich mit der Ablegung der Doktorprüfung am 22. Dezember 1926.